

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Microbiología II**



**UNIDAD DE CAPTURA Y DISPERSIÓN GÉNICA  
EN LA EVOLUCIÓN DE LAS  $\beta$ -LACTAMASAS DE  
ESPECTRO EXTENDIDO.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Ângela Patrícia da Silva Novais Amorim**

Bajo la dirección de los doctores

María Teresa Coque González  
Fernando Baquero Mochales

**Madrid, 2010**

- ISBN: 978-84-692-9837-4



**Universidad Complutense de Madrid**  
**Facultad de Farmacia - Departamento de Microbiología II**

***Unidades de Captura y Dispersión Génica en la***  
***Evolución de las  $\beta$ -Lactamasas de Espectro***  
***Extendido***

Tesis doctoral presentada por  
**Ângela Patrícia da Silva Novais Amorim**  
para obtención del grado de doctor

**VºBº**  
**LOS DIRECTORES DEL TRABAJO**

**Dra. María Teresa Coque González Dr. Fernando Baquero Mochales**

**Hospital Universitario Ramón y Cajal - Servicio de Microbiología**  
**Madrid, Julio 2008**





Memoria presentada en la Facultad de Farmacia  
de la *Universidad Complutense de Madrid*  
para obtener el grado de doctor en Microbiología

## **Tutores**

**Dra. Teresa Coque.** Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal.  
Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana, Consejo Superior de  
Investigaciones Científicas

**Dr. Fernando Baquero.** Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal.  
Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana, Consejo Superior de  
Investigaciones Científicas





# **Unidades de Captura y Dispersión Génica en la Evolución de las $\beta$ -Lactamasas de Espectro Extendido**

Este trabajo fue financiado por:

- Ministerio de Ciencia y Tecnología de España (SAF 2003-09285)
- Ministerio de Educación y Ciencia de España, Programa Acciones Integradas cooperación entre los gobiernos de España y Portugal (HP03-97)
- Unión Europea. Sexto y Séptimo Programa Marco en Investigación, Desarrollo Tecnológico y e Innovación (COBRA LSHM-CT-2003-503335; DRESP2 (LSHM-CT-2005-018705)
- Ministerio de Ciencia y Tecnología de Portugal (SFRH/BD/24604/2005; POCI/SAU/61385/2004)
- Iniciativa Ingenio 2010, Programa Consolider, Centros de Investigación Biomédica en Red (Acciones CIBER). Area de Epidemiología y Salud Pública (CB06/02/0053)





*Ao Renato e aos meus pais*





## **AGRADECIMIENTOS**

“Cualesquiera que hayan sido nuestros logros,  
alguien nos ayudó siempre a alcanzarlos.”

**Althea Gibson**



A todos los que contribuyeron a este viaje por el mundo de la ciencia, y a los que de cerca o de lejos hicieron con que este aprendizaje fuera posible, les dejo mis palabras de reconocimiento.

En primer lugar, me gustaría expresar mi más profunda gratitud a la Dra. Teresa Coque por haber confiado en mí y haberme dado esta oportunidad. Su estímulo, ejemplo y dedicación fueron imprescindibles durante todo este tiempo. Además, por haber compartido conmigo su experiencia, formándome en la tarea científica y en los valores fundamentales para un buen desempeño profesional. Y finalmente por su disponibilidad incondicional, por su apoyo en fases decisivas y por su amistad.

Al Dr. Fernando Baquero, desearía dirigir un agradecimiento especial por haberme recibido en su laboratorio, y estimulado para profundizar mi formación en Microbiología y porque siempre será para mí una referencia, tanto por su excelencia a nivel profesional como por su grandeza humana. Su orientación y sus enseñanzas han tenido un enorme valor para mi formación y para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Rafael Cantón, la persona que en determinado momento fue decisiva para que optase por volver a Madrid e iniciar este estudio, porque ha resultado ser un importante apoyo y porque constituye un gran ejemplo de profesionalidad, integridad y amistad. Por su estímulo constante en el laboratorio, por haberme dedicado su precioso tiempo cuando lo necesitaba y finalmente, por haber confiado en mí.

Al Dr. Juan Carlos Galán, de quién aprendí algunos de los conceptos aplicados en este estudio y con quien colaboré en alguno de los trabajos desarrollados en esta tesis. Por su contribución a mi formación y por haber contado con su apoyo siempre que lo he necesitado.

Al Dr. José Claudio Pérez-Díaz, por habernos cedido su espacio y permitido desarrollar el trabajo en la primera etapa de esta tesis. Por su enorme ayuda en resolver cualquier duda en el laboratorio y por compartir su sabiduría con todos los miembros del grupo.

A todos los miembros del Servicio de Microbiología, por el cariño con el que me recibieron y por haber hecho que me sienta en casa.

A todos mis compañeros de trabajo, muchísimas gracias por todos los momentos del laboratorio. Una mención especial a Arancha, presente desde el principio y esencial en mi integración en el laboratorio. A Carmen y María, con quienes he podido compartir algunos de

los momentos más divertidos. A Patricia, Marta y Elia, por su amistad y ayuda en muchos momentos, y por la compañía en algunas de sus guardias. También a nuestros compañeros más recientes, Manu y Aida por su amistad dentro y fuera del laboratorio, por los momentos de risa y por su apoyo en la fase final de la tesis.

A mis compañeras portuguesas, Tânia, Ana R. y Eli, con quien siempre he tenido una relación especial, quiero agradecer la amistad incondicional, los consejos valiosos, el incentivo constante y la preciosa ayuda en todos los momentos.

A todas las estudiantes que pasaron por el laboratorio (Joana, Raquel, Ana T., Inês, Maria Emilia y Ana Sofia), que trabajaron conmigo durante su estancia y con cuya ayuda siempre he podido contar.

A mis amigos de siempre, especialmente a Anabela, Carla, Rui, Visses, Mi, Carlinha, Jota y Susy, por no haberme fallado nunca. Por su comprensión en relación a mi constante falta de tiempo, por haberme escuchado y aconsejado en los momentos más duros y por su voto de confianza.

A mi hermano Pedro, que siempre me animó a aceptar este desafío en Madrid y que contribuyó de forma esencial a mi desarrollo personal y emocional. Y a mi sobrina Inês porque me sigue queriendo igual...

A mis padres, por el cariño, la comprensión y la fuerza que me han transmitido a lo largo de los años y porque sin su apoyo no estaría aquí.

A mi marido, Renato, por el amor y el cariño, por su paciencia, dedicación y confianza en todo momento. Y por su apoyo incondicional, que tanto ha contribuido a mi estabilidad emocional. Sin él, este recorrido hubiera sido mucho más difícil.

Y finalmente, a todos aquellos que de alguna forma contribuyeron a la realización de este trabajo y me ayudaron a alcanzar este objetivo.

Muchísimas gracias...

# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. El problema de la resistencia a antibióticos.....	3
1.2. Ecología y estructura poblacional de <i>Enterobacteriaceae</i> .....	4
1.3. Elementos de transferencia horizontal en <i>Enterobacteriaceae</i> .....	6
1.3.1. Plásmidos.....	6
1.3.1.1. Plásmidos conjugativos.....	7
1.3.1.2. Plásmidos no conjugativos.....	9
1.3.2. Transposones.....	16
1.3.2.1. Secuencias de inserción.....	16
1.3.2.2. Transposones de clase I.....	17
1.3.2.3. Transposones de clase II.....	18
1.3.2.4. Transposones de la familia Tn5090-Tn7.....	19
1.3.2.5. Transposones conjugativos.....	19
1.3.3. Integrones.....	22
1.4. Resistencia a antibióticos en <i>Enterobacteriaceae</i> .....	24
1.4.1. Resistencia a antibióticos $\beta$ -lactámicos.....	25
1.4.1.1. Las $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.....	26
1.4.1.2. Otras $\beta$ -lactamasas con importancia clínica.....	33
1.4.2. Resistencia a antibióticos no $\beta$ -lactámicos asociados a cepas con BLEE	35
1.4.3. Evolución de las $\beta$ -lactamasas de tipo CTX-M.....	36
1.4.3.1. Estrategias desarrolladas para la predicción de la aparición de nuevas variantes con mayor espectro de actividad.....	37
<b>CAPÍTULO 2 - HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
<b>CAPÍTULO 3 - RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
3.1. Epidemiología de <i>Enterobacteriaceae</i> productores de BLEE (1988-2004).....	45
3.1.1. Caracterización de la estructura poblacional de <i>Enterobacteriaceae</i> .....	47
3.1.2. Caracterización de plásmidos con genes BLEE.....	50
3.1.3. Caracterización de transposones con genes BLEE.....	51
3.1.4. Caracterización de integrones.....	54
3.2. Epidemiología molecular de conjuntos evolutivos en <i>Enterobacteriaceae</i> productoras de BLEE.....	56

3.2.1. Epidemiología molecular de la resistencia mediada por CTX-M-9.....	56
3.2.1.1. Estructura poblacional de los aislados productores de CTX-M-9.....	57
3.2.1.2. Identificación de los plásmidos que codifican la producción de CTX-M-9....	57
3.2.1.3. Caracterización de integrones asociados a Tn402.....	60
3.2.1.4. Asociación del In60 a Tn21.....	62
3.2.2. Epidemiología molecular de la resistencia mediada por TEM-24.....	63
3.2.2.1. Estructura poblacional de aislados que codifican la producción de TEM-24	63
3.2.2.2. Identificación de los plásmidos que codifican la producción de TEM-24....	64
3.2.2.3. Caracterización de integrones y su asociación con derivados de Tn402 y Tn21	64
3.2.3. Epidemiología molecular de la resistencia mediada por enzimas de la familia CTX-M-1.....	69
3.2.3.1. Epidemiología de aislados productores de enzimas tipo CTX-M-1, -3 y -32	70
3.2.3.2. Epidemiología de aislados productores de CTX-M-15.....	71
3.2.3.3. Caracterización de los plásmidos que codifican la producción de CTX-M-15	72
3.3. Predicción de la aparición de nuevas variantes CTX-M con mayor resistencia a ceftazidima.....	76
3.3.1. Evolución <i>in vitro</i> de <i>E. coli</i> GB20 conteniendo <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> y <i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> .....	77
3.3.2. Mutagénesis dirigida de <i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> .....	78
3.3.3. Evolución <i>in vitro</i> de <i>E. coli</i> GB20 conteniendo <i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub> .....	78
3.3.4. Mutagénesis dirigida de <i>bla</i> <sub>CTX-M-10</sub> .....	79
<b>CAPÍTULO 4 - DISCUSIÓN.....</b>	<b>83</b>
4.1. Genética de poblaciones microbianas y cambio epidemiológico de las BLEE.....	85
4.2. Caracterización de las unidades de captura génica y dispersión clonal.....	86
4.3. Diversificación de los genes <i>bla</i> <sub>BLEE</sub> .....	91
<b>CAPÍTULO 5 – CONCLUSIONES.....</b>	<b>95</b>
<b>CAPÍTULO 6 – BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>99</b>
<b>CAPÍTULO 7 – ANEXOS.....</b>	<b>127</b>
7.1. Materiales y Métodos.....	129
7.1.1. Microorganismos.....	129
7.1.1.1. Aislados productores de BLEE del Hospital Universitario Ramón y Cajal.....	129
7.1.1.2. Aislados productores de BLEE representativos de otros países.....	130

<b>7.1.2. Medios y condiciones de cultivo.....</b>	<b>130</b>
<b>7.1.3. Identificación de especies bacterianas.....</b>	<b>131</b>
<b>7.1.4. Estudios de sensibilidad a antimicrobianos.....</b>	<b>131</b>
7.1.4.1. Agentes antimicrobianos.....	131
7.1.4.2. Técnicas utilizadas.....	132
a) Microdilución en caldo.....	132
b) Difusión en disco-placa.....	133
c) Tiras de Épsilon-test (E-test).....	133
<b>7.1.5. Técnicas moleculares.....</b>	<b>134</b>
7.1.5.1. Extracción de ADN.....	134
a) ADN genómico .....	134
b) ADN plasmídico.....	135
7.1.5.2. Digestión de ADN.....	136
7.1.5.3. Amplificación de ADN .....	136
7.1.5.4. Separación de ADN.....	137
a) Electroforesis de corriente continua.....	137
b) Electroforesis en corriente alterna o electroforesis de campo pulsado (ECP)....	138
c) Preparación de geles de agarosa.....	139
d) Tinción y visualización.....	139
7.1.5.5. Clonación de ADN.....	139
7.1.5.6. Identificación y tipaje.....	140
a) Hibridación.....	140
b) <i>Multi-Locus Sequence-Typing</i> (MLST).....	142
7.1.5.7. Análisis bioinformático.....	143
<b>7.1.6. Estructura poblacional de <i>Enterobacteriaceae</i> productores de BLEE.....</b>	<b>143</b>
7.1.6.1. Determinación de grupos filogenéticos de <i>Escherichia coli</i> .....	144
<b>7.1.7. Caracterización de <math>\beta</math>-Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE).....</b>	<b>144</b>
7.1.7.1. Detección fenotípica.....	144
7.1.7.2. Detección de la presencia de $\beta$ -lactamasa.....	145
7.1.7.3. Determinación del punto Isoeléctrico.....	146
7.1.7.4. Amplificación e identificación de su secuencia genética.....	147
7.1.7.5. Localización del gen <i>bla</i> : plásmido/cromosoma.....	147
<b>7.1.8. Estudios de transferibilidad.....</b>	<b>147</b>
7.1.8.1. Conjugación.....	147
7.1.8.2. Transformación.....	148
<b>7.1.9. Análisis de los Elementos de Transmisión Horizontal (ETH).....</b>	<b>149</b>



7.1.9.1. Secuencias de inserción.....	149
7.1.9.2. Plásmidos.....	149
a) Extracción de plásmidos.....	149
b) Identificación del grupo de incompatibilidad.....	149
c) Discriminación entre plásmidos.....	151
d) Determinación del número y tamaño molecular.....	151
7.1.9.3. Integrones.....	151
a) Entorno genético de integrones de clase 1: caracterización de Tn402 y Tn21...	152
<b>7.1.10. Evolución de genes pertenecientes a la familia bla<sub>CTX-M-1</sub>.....</b>	<b>154</b>
7.1.10.1. Obtención de transformantes.....	154
7.1.10.2. Pases seriados en concentraciones crecientes de ceftazidima.....	154
7.1.10.3. Mutagénesis dirigida.....	155
<b>7.2. Abreviaturas.....</b>	<b>163</b>
<b>7.3. Composición de soluciones y reactivos.....</b>	<b>165</b>
<b>7.4. Publicaciones.....</b>	<b>169</b>
<b>7.4.1. Artículos originales.....</b>	<b>169</b>
7.4.1.1. A multi-resistant IncA/C <sub>2</sub> plasmid containing Tn21 and Tn1696 derivatives causes international spread of TEM-24 among <i>Enterobacteriaceae</i> . 2008. En revisión editorial.	
7.4.1.2. Mutational events in ESBL-ceftoximases of the CTX-M-1 cluster involved in ceftazidime resistance. <i>Antimicrob Agents Chemother</i> . 52 (7). 2008; En prensa.	
7.4.1.3. Dissemination of clonally related <i>Escherichia coli</i> strains expressing CTX-M-15 extended-spectrum $\beta$ -lactamase. 2008; <i>Emerg Infect Dis</i> . 14(2):195-200.	
7.4.1.4. Emergence and dissemination of <i>Enterobacteriaceae</i> isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad host range (CTX-M-1, -3, -32) plasmids. 2007; <i>Antimicrob Agents Chemother</i> . 51(2):796-9.	
7.4.1.5. Dissemination and persistence of bla <sub>CTX-M-9</sub> are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1- $\alpha$ , and IncFI groups. 2006. <i>Antimicrob Agents Chemother</i> ; 50(8):2741-50.	
7.4.1.6. Preservation of integron types among <i>Enterobacteriaceae</i> producing extended-spectrum $\beta$ -lactamases in a spanish hospital over a 15-year period (1988-2003). 2007. <i>Antimicrob Agents Chemother</i> ; 51(6):2201-4.	
7.4.1.7. High diversity of extended-spectrum $\beta$ -lactamases among clinical isolates of	

<i>Enterobacteriaceae</i> from Portugal. 2007. <i>J Antimicrob Chemother</i> ; 60(6):1370-4.	
7.4.1.8. Antibiotic coresistance in extended-spectrum $\beta$ -lactamase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> and <i>in vitro</i> activity of tigecycline. 2006; <i>Antimicrob Agents Chemother</i> . 50(8):2695-2699.	
<b>7.4.2. Manuscritos en preparación (presentados en congresos).....</b>	<b>170</b>
7.4.2.1. Evolutionary trajectories among extended beta-lactamase enzymes belonging to the CTX-M-1 cluster. 18 <sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, oral presentation 0342, Barcelona, Abril 2008.	
7.4.2.2. La diseminación y persistencia de TEM-4 en España se asocia a clones persistentes de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> y plásmidos epidémicos de la familia repFIIA. XIII Congreso de la Sociedad Española de de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Poster número 17. Madrid, Mayo 2008.	
7.4.2.3. Recent Dissemination of <i>bla</i> <sub>TEM-52</sub> -producing <i>Enterobacteriaceae</i> in Portugal is caused by spread of IncII plasmids among <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> clones. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Poster presentation. Barcelona, Abril 2008.	
<b>7.4.3. Artículos de revision.....</b>	<b>170</b>
7.4.3.1. Prevalence and spread of extended spectrum $\beta$ -lactamase producing <i>Enterobacteriaceae</i> in Europe. 2008; <i>Clin Microbiol Infect</i> . <b>1</b> :144-53. Review.	
7.4.3.2. Evolución y panorama actual de las BLEE. 2007; <i>Enferm Infecc Microbiol Clin</i> . 2007. 25;supl 2:2-10.	

## LISTA DE FIGURAS

**Capítulo 1, figura 1 (Pág. 4).** Microorganismos y el ambiente. El uso de antibióticos y sus principales reservorios: humanos (pacientes hospitalizados y de la comunidad), animales y el ambiente.

**Capítulo 1, figura 2 (pág. 7).** La estructura de los plásmidos.

**Capítulo 1, figura 3 (pág. 16).** Representación esquemática de una secuencia de inserción.

**Capítulo 1, figura 4 (pág. 17).** Representación esquemática de ejemplos clásicos de transposones compuestos y de transposones de clase II.

**Capítulo 1, figura 5 (pág. 22).** Representación esquemática de un integrón.

**Capítulo 1, figura 6 (pág. 22).** Integrones de clase 1 derivados de Tn402.

**Capítulo 1, figura 7 (pág. 32).** Distribución mundial de enzimas de tipo CTX-M.

**Capítulo 3, figura 8 (pág. 46).** Distribución de los aislamientos de *E. coli* productores de BLEE del Hospital Universitario Ramón y Cajal por grupo de BLEE (1988-2002).

**Capítulo 3, figura 9 (pág. 46).** Distribución temporal (A) y compartimental (B) de los aislamientos de *Enterobacteriaceae* productores de BLEE del Hospital Universitario Ramón y Cajal (1988-2005).

**Capítulo 3, figura 10 (pág. 49).** Distribución de aislados de *E. coli* productores de BLEE por grupo filogenético (Hospital Universitario Ramón y Cajal (1988-2002).

**Capítulo 3, figura 11 (pág. 57).** Estructura del In60, integrón de clase 1 que contiene *bla*<sub>CTX-M-9</sub>.

M-9.

**Capítulo 3, figura 12 (pág. 59).** Caracterización de plásmidos IncHI2.

**Capítulo 3, figura 13 (pág. 61).** Representación esquemática del elemento que contiene *bla*<sub>CTX-M-9</sub>.

**Capítulo 3, figura 14 (pág. 67).** Elementos de resistencia a antibióticos caracterizados por ensayos de PCR solapadas en plásmidos IncA/C<sub>2</sub> que codifican TEM-24.

**Capítulo 3, figura 15 (pág. 71).** Discriminación de aislados productores de CTX-M-15.

**Capítulo 3, figura 16 (pág. 75).** Perfiles de huella dactilar de plásmidos productores de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> tras digestión con *Hpa*I.

**Capítulo 3, figura 17 (pág. 75).** Análisis bioinformático de perfiles de huella dactilar (*Hpa*I) representativos de plásmidos IncFII que contienen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>.

**Capítulo 1, figura 18 (pág. 76).** Reconstrucción filogenética de enzimas de tipo CTX-M.

**Capítulo 7, figura 19 (pág. 133).** Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos por E-test.

**Capítulo 7, figura 20 (pág. 141).** Esquema representativo de un sistema de transferencia de ADN por *Southern blot*.

**Capítulo 7, figura 21 (pág. 145).** Identificación de los grupos filogenéticos de *E. coli* según el esquema de PCR múltiple descrito por Clermont y *col* (84).

**Capítulo 7, figura 22 (pág. 145).** Detección de la producción de BLEE por el test de sinergia con doble disco (DDST).

**Capítulo 7, figura 23 (pág. 153).** Esquema de PCR solapantes utilizado para la caracterización de integrones de clase 1 derivados de Tn402 y transposones mercuriales de la familia Tn21.

## LISTA DE TABLAS

**Capítulo 1, tabla 1 (pág. 10).** Plásmidos conjugativos de diferentes grupos de incompatibilidad en *Enterobacteriaceae*.

**Capítulo 1, tabla 2 (pág. 21).** Distribución y diversidad de de transposones conjugativos y movilizables en bacterias Gram negativas.

**Capítulo 1, tabla 3 (pág. 27).** Clasificación de  $\beta$ -lactamasas.

**Capítulo 1, tabla 4 (pág. 29).** Origen de los distintos tipos de BLEE.

**Capítulo 3, tabla 5 (pág. 52).** Entorno genético, tipos de plásmidos, especies y grupos filogenéticos asociados a *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE en el Hospital Universitario Ramón y Cajal (1988-2004).

**Capítulo 3, tabla 6 (pág. 55).** Integrones de clase 1 y 2 en aislados de *Enterobacteriaceae* productoras y no-productores de BLEE de distintos orígenes del HRyC (1988-2003).

**Capítulo 3, tabla 7 (pág. 61).** Caracterización de variantes de integrones de clase 1 por PCR solapantes basadas en la estructura de In60 y de secuencias relacionadas con Tn402.

**Capítulo 3, tabla 8 (pág. 68).** Datos epidemiológicos y caracterización plásmidica de *Enterobacteriaceae* multi-resistentes productores de TEM-24.

**Capítulo 3, tabla 9 (pág. 80).** Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para diferentes antibióticos  $\beta$ -lactámicos de las variantes CTX-M-1 obtenidas en la naturaleza o en experimentos de selección *in vitro*.

**Capítulo 3, tabla 10 (pág. 81).** Influencia de las substituciones A77V y N106S obtenidas por mutagénesis dirigida sobre la sensibilidad a cefalosporinas de tercera generación en las distintas variantes CTX-M-1.

**Capítulo 7, tabla 11 (pág. 150).** Identificación de los grupos de incompatibilidad de los plásmidos conjugativos de *Enterobacteriaceae* utilizando un esquema PCR múltiple.

**Capítulo 7, tabla 12 (pág. 156).** Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR, condiciones de amplificación para caracterización de *Enterobacteriaceae* portadores de genes *bla*.

# Capítulo 1

---

## INTRODUCCIÓN

“Prefiero que mi mente se abra movida por la curiosidad,  
a que se cierre movida por la convicción.”

**G. Spence**



## 1.1. El problema de la resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos constituye actualmente un problema de gran impacto en salud pública. La sobre-utilización de antibióticos en medicina, veterinaria y en agricultura, ha originado un incremento continuado de fracasos en la terapia antimicrobiana debido al aumento en número y diversidad de microorganismos resistentes (260).

El estudio de la resistencia a antibióticos ha estado centrado durante décadas en la detección de patógenos nosocomiales, como *Klebsiella* multi-resistentes, enterococos resistentes a vancomicina (VRE) y *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Otros microorganismos oportunistas multi-resistentes causantes de infecciones importantes en los hospitales son *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia*. En los últimos años, las infecciones adquiridas en la comunidad han centrado el interés del personal médico y científico internacional debido a la rápida diseminación de cepas resistentes y de genes de resistencia entre humanos, y también entre animales y en productos alimentarios (496). Las medidas para controlar la diseminación de la resistencia a antibióticos propuestas en 1995 por la ASM en el clásico informe “Report of the ASM task force on antibiotic resistance” han resultado insuficientes ya que estaban dirigidas al control de sub-poblaciones resistentes en el medio hospitalario, no teniendo en cuenta la diseminación de elementos de resistencia transmisibles o la co-selección de diferentes genes de resistencia localizados en los mismos elementos o plataformas genéticas.

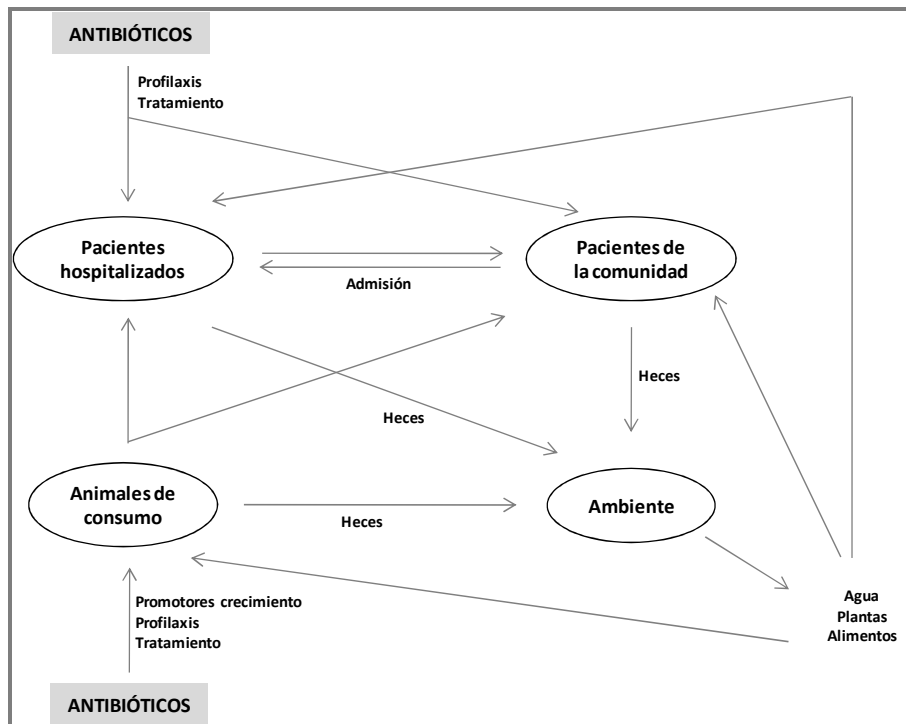
Distintas organizaciones como la Organización Mundial de la Salud (WHO, [www.who.org](http://www.who.org)) o la Sociedad Americana de Microbiología (ASM, [www.asm.org](http://www.asm.org)), entre otras, han seleccionado el análisis de las variaciones temporales y espaciales de las especies bacterianas responsables de enfermedades infecciosas en humanos como uno de los temas de estudio prioritarios en salud pública. En este sentido, en el año 2003 se creó un nuevo sistema de vigilancia, el Reservoirs of Antibiotic Resistance (ROAR) con el objetivo de conocer el papel de la flora comensal en la aparición y diseminación de resistencia a diferentes antibióticos ([www.roarproject.org](http://www.roarproject.org)).

Los nuevos retos de la resistencia a antibióticos pueden resumirse en: i) el aumento mundial en la prevalencia de microorganismos multi-resistentes tanto en los hospitales como en la comunidad, con diferencias geográficas importantes, ii) la selección y amplificación de clones epidémicos y de elementos móviles de resistencia en humanos, animales o en el medioambiente, y iii) la aparición y diseminación de nuevos genes de resistencia de origen medioambiental y de sus unidades genéticas dispersoras (502).

Los avances en genómica y proteómica de los últimos años han permitido comprender que el entorno hospitalario no es un nicho ecológico aislado sino que está en constante flujo de intercambio genético con el medio ambiente (figura 1). Por ello, resulta necesario abordar el



problema de la resistencia antibiótica *desde una perspectiva ecológica*, es decir, comprender el efecto medioambiental de los agentes biocidas (*antibióticos, detergentes/antisépticos, metales pesados y sustancias orgánicas tóxicas o xenobióticas*) como agentes modificadores de la estructura poblacional de los microorganismos, alterando la biodiversidad en distintos nichos ecológicos y eventualmente influyendo sobre la aceleración de los procesos adaptativos y en última instancia sobre la evolución de las bacterias.



**Figura 1. Microorganismos y el ambiente.** El uso de antibióticos y sus principales reservorios: humanos (pacientes hospitalizados y de la comunidad), animales y el medio ambiente exterior.

## 1.2. Ecología y estructura poblacional de *Enterobacteriaceae*

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son microorganismos ubicuos, asociados al tracto gastrointestinal de humanos y animales, y muchas de sus especies, a diversos nichos ecológicos como plantas, suelo y agua. Estas bacterias Gram-negativas son patógenos humanos oportunistas relacionados con infecciones de adquisición nosocomial y comunitaria (304).

Los microorganismos pertenecientes a los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* están frecuentemente asociados a infecciones intestinales y son considerados patógenos entéricos (497). Las especies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. o *Serratia marcescens* son responsables también de infecciones extraintestinales, principalmente septicemias o infecciones del tracto urinario y del tracto respiratorio (160).

Las dos especies más estudiadas son *E. coli* y *K. pneumoniae*, siendo *E. coli* el patógeno oportunista causante de infecciones extraintestinales en pacientes hospitalizados o de la comunidad aislado con mayor frecuencia. El análisis de los perfiles enzimáticos por la técnica de *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) ha permitido subdividir las poblaciones de *E. coli* en 4 grupos filogenéticos y sus correspondientes sub-grupos: A (A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>), B1, B2 (B2<sub>2</sub>, B2<sub>3</sub>) y D (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>) (84, 138, 192, 325). Se ha sugerido una relación entre filogenia y patogénesis debido a que la mayoría de las cepas virulentas responsables de infecciones extra-intestinales se asocian con los grupos D y B2, mientras que las cepas comensales pertenecen generalmente a los filogrupos A y B1 (84, 131, 212, 363). Algunos estudios han descrito la influencia de factores medioambientales como la zona geográfica, el clima o el hospedador (raza, edad o sexo) en la distribución de determinados genotipos de *E. coli*, lo cual podría reflejar la adaptación de las poblaciones de *E. coli* a distintos nichos ecológicos dando lugar a distintos ecotipos (88, 138, 168, 171, 436, 437). Aunque la diversidad y la evolución en esta especie están influenciadas por fenómenos de recombinación homóloga directamente relacionados con la adquisición de distintos genes implicados en virulencia (434, 437, 495), los estudios clásicos indican que *E. coli* posee globalmente una estructura poblacional clonal (82, 434).

La expansión geográfica y ecológica de diferentes clones o complejos clonales de *E. coli* de distintos grupos filogenéticos ha sido documentada en distintos estudios (10, 367, 493). Algunos ejemplos representativos son el clon correspondiente a la secuencia tipo ST131 responsable de infecciones urinarias y el clon VIII serotipo O81 colonizador específico del tracto gastrointestinal humano pertenecientes al filogrupo B2; los aislados uropatógenos del complejo clonal ST69 del filogrupo D; el complejo clonal ST10 del filogrupo A ampliamente diseminado en humanos y animales y los aislados productores de hyaluronidasa del grupo filogenético B1 asociados a animales (94, 109a, 138a, 209, 241a, 272, 467). Otras especies frecuentemente implicadas en infecciones nosocomiales como *Enterobacter* spp. o *K. pneumoniae* han sido asociadas a brotes epidémicos causados por clones persistentes y resistentes a múltiples antibióticos (48, 95, 117). *K. pneumoniae* se ha subdividido en 3 grupos distintos (KpI, KpII y KpIII), siendo KpI el más frecuentemente asociado a infecciones nosocomiales en humanos y en animales (58, 59). Los aislados resistentes de *Klebsiella* suelen exhibir una gran variabilidad genética (distintos STs), pese a que las secuencias tipo ST14 y ST15 han sido identificadas en aislados de distintos países (122).

Una parte de la diversidad observada en las bacterias patógenas parece ser debida a la adquisición de determinantes genéticos por transmisión horizontal (326, 484a, 495). La selección de algunos clones actualmente muy distribuidos en diferentes compartimentos o zonas geográficas puede haber ocurrido debido a la adquisición de factores de virulencia-colonización o determinantes de resistencia a antibióticos (53, 138, 211, 212, 451).

### 1.3. Elementos de transferencia horizontal en *Enterobacteriaceae*

La transferencia horizontal parece tener un papel crucial en la adaptación bacteriana a nichos ecológicos específicos y en la diseminación y la persistencia de la resistencia a antibióticos entre miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (30, 148). La estructura modular de los elementos de transferencia horizontal favorece el intercambio entre distintos elementos genéticos, dotando de una gran plasticidad a las poblaciones bacterianas (335, 463). Recientemente se ha sugerido que la transferencia horizontal está más favorecida por la proximidad entre microorganismos que comparten características genéticas como el tamaño del genoma o su contenido en G+C que por su proximidad filogenética (204). Estos grupos bacterianos que intercambian material genético de forma preferencial son denominados “comunidades de intercambio genético” (“*exchange communities*”)

A continuación, se analizan los principales elementos genéticos móviles asociados a la diseminación de la resistencia a antibióticos en *Enterobacteriaceae*.

#### 1.3.1. Plásmidos

Los plásmidos que confieren resistencia a antibióticos fueron descritos inicialmente en 1963 por Mitsuhashi Watanabe y correspondían a aislados multiresistentes de *Shigella flexneri* que habían sido identificados en Japón a principios de la década de 1950, demostrándose poco después su transmisibilidad entre bacterias (454, 486). Años más tarde, Hughes y Datta identificaron la presencia de plásmidos conjugativos en una colección de cepas clínicas de enterobacterias aisladas en la era “pre-antibiótica” (1917-1954) y denominada “colección de Murray” y sugirieron que la diseminación de los genes de resistencia estaba favorecida por su localización en plásmidos correspondientes a los mismos tipos que los identificados con anterioridad a la introducción de los antibióticos en el arsenal terapéutico (114, 199).

Los plásmidos se componen de una *región constante* que contiene los genes responsables de funciones esenciales como la replicación, el mantenimiento y la transferencia, y una *región variable* donde se localizan los genes responsables de funciones adaptativas (resistencia a antibióticos, factores de virulencia, o producción de bacteriocinas) (figura 2, 333, 454, 458).

La clasificación de los plásmidos se ha realizado en base a diferentes criterios, como el número de copias, el rango de hospedador, el grupo de incompatibilidad, y su capacidad de transferencia entre células. Esta última característica permite diferenciar estos elementos en plásmidos conjugativos y plásmidos movilizables (99, 146, 157, 324, 454).

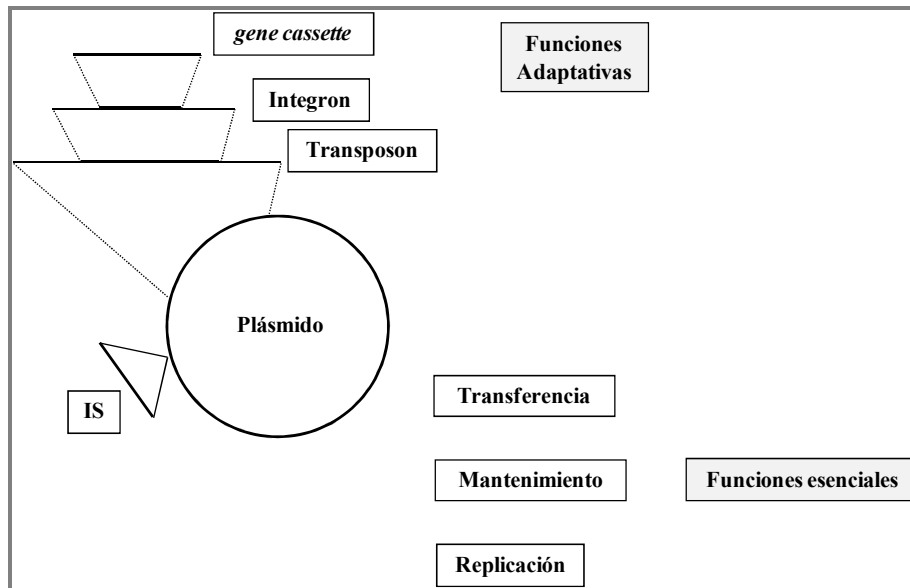


Figura 2. La estructura de los plásmidos (adaptada de la referencia 333).

#### 1.3.1.1. Plásmidos conjugativos

Los plásmidos fueron inicialmente clasificados en los años 60 en base a la presencia de marcadores fenotípicos como la resistencia a antibióticos o la producción de bacteriocinas, diferenciándose poco después en plásmidos F<sup>+</sup> y plásmidos F<sup>-</sup> según la capacidad de transferencia de un plásmido F en presencia de lo que llamaron *factor F*. En 1969, Meynell y Datta observaron una correlación entre el “status F” y el pili que producían diferenciando los plásmidos en tipo F (plásmidos fi<sup>+</sup>) y tipo I (fi<sup>-</sup>). La diferenciación basada en fi<sup>+</sup> y fi<sup>-</sup> o familias F e I se hizo pronto insuficiente ya que algunos de los plásmidos identificados en años posteriores no se ajustaban a estas características, lo que indujo a utilizar otros criterios de clasificación basados en propiedades universales como la replicación (454). A principios de los años 70, Datta y Hegdes desarrollaron un esquema de clasificación de plásmidos de enterobacterias basado en la incompatibilidad o en la presencia de elementos comunes implicados en la replicación y/o partición o de control del número de copias (113, 324). Los plásmidos que pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad (Inc) no pueden coexistir en la misma célula al compartir los mismos mecanismos de replicación (excepto en caso de recombinación, en el que sólo actúa un mecanismo dominante) (454). Los plásmidos conjugativos que formaron parte de la Colección Nacional de Cepas Tipo de Gran Bretaña (*Plasmid Section of National Collection of Type Cultures*) custodiados por Naomi Datta de 1960 a 1982 fueron clasificados en 21 grupos de incompatibilidad designados por letras mayúsculas B, C, D, FI, FII, FIII, FIV, FV, FVI, HI1, HI2, I1-I7, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B /O, X (tabla 1). La caracterización de los grupos Inc se realiza actualmente por sistemas de tipaje basados en la identificación de secuencias de la región del control de replicación por PCR o hibridación con

sondas específicas: *ori* (origen de replicación), *cop/inc* (control de inicio de replicación) y *rep* (replicación y control) (77, 99).

Los plásmidos conjugativos se subdividen en dos grandes grupos según el mecanismo de control de replicación. Un grupo está formado por aquellos elementos en los cuales el reconocimiento del sitio *ori* se hace a través de la ligación de la proteína Rep a iterones (secuencias repetidas de ADN) e incluye pPS10 de *Pseudomonas*, pRK2 (prototipo del grupo IncP en *Enterobacteriaceae*) o R27 y R478 (prototipos de los grupos IncHI1 e IncHI2, respectivamente) (313, 316, 339, 341). Otro grupo está representado por los plásmidos cuyo control de replicación se realiza negativamente (“*control antisense*”), es decir, a partir de una molécula de ARN “antisense” (*copA*) que inhibe la síntesis de RepA. A este grupo pertenecen los plásmidos de la familia repFIIA a la que pertenecen los grupos IncFII (cuyo prototipo es el plásmido R100), IncFIC, IncZ y los plásmidos del complejo IncI (IncB/O, IncK, IncI1 e IncL/M) (11, 183, 359, 381).

La existencia de plásmidos con múltiples replicones parece ser frecuente y característico de determinados grupos Inc, como IncF e IncHI (33, 164, 423). Las variaciones en las secuencias de *copA* mediadas por recombinación homóloga (secuencias Chi) originan replicones mosaico y parecen determinar la evolución hacia nuevos grupos de incompatibilidad, como ocurre con los plásmidos de las familias IncFII e IncI (223, 334). Por otra parte, la evolución de los plásmidos está influenciada por eventos de recombinación homóloga y por el intercambio genético de ADN de diferentes orígenes mediado por los elementos de transferencia horizontal que origina la formación de estructuras mosaico (51, 335, 391).

La persistencia y evolución de estos elementos están favorecidas por la presencia de genes que confieren resistencia a diversas familias de antibióticos ( $\beta$ -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas, aminoglucosidos u otros), a metales pesados (mercurio, arsénico o plata) y/o genes que codifican la producción de factores de virulencia. Los plásmidos conjugativos relacionados con la resistencia a antibióticos más comunes pertenecen a grupos de espectro reducido (IncFII, IncHI2 o IncI1) y amplio espectro de huésped (IncP, IncN, o IncA/C) (79, 197, 454).

El mantenimiento de los plásmidos en las poblaciones bacterianas está influenciado por su eficiente dispersión, por sistemas de mantenimiento específicos como los sistemas de partición activa (*par*), los sistemas de restricción-modificación (RM) o los sistemas toxina-antitoxina (TA) conocidos también como sistemas de muerte post-segregacional (*post-segregational killing*, PSK) que aseguran la muerte de la célula que segrega el plásmido que contiene, o por posibles interacciones específicas con los hospedadores (55, 124, 185, 188, 424). Sin embargo, gran parte de lo que se conoce sobre la adaptación de algunos plásmidos a hospedadores específicos está basado en modelos teóricos (34, 125, 189).

### 1.3.1.2. Plásmidos no conjugativos

Los *plásmidos movilizables* son plásmidos pequeños con un alto número de copias, cuya región constante está constituida por una región *mob* (necesaria para la movilización) y una región *ori* (origen de replicación). Su transmisibilidad depende de la presencia de un módulo de conjugación de otro elemento genético. Francia y *col* han propuesto un esquema de clasificación de estos plásmidos basado en las diferencias de sus relaxasas, proteínas esenciales para el inicio de la transferencia del ADN tanto en plásmidos conjugativos como en plásmidos movilizables (146). Los plásmidos movilizables han contribuido también a la diseminación de genes de resistencia y virulencia (208, 253, 292, 398). Los tipos más emblemáticos son los plásmidos Col y los IncQ (432, 389, 419).

Los plásmidos *Col* se caracterizan por la producción de colicinas, exoproteínas tóxicas (bacteriocinas) producidas por algunos miembros de *Enterobacteriaceae*, principalmente *E. coli* (432). Su prototipo es el grupo ColE formado por plásmidos de espectro restringido con un sistema de control de replicación similar al de la familia repFIIA, paradigma de los plásmidos conjugativos de enterobacterias. Algunos genes *bla<sub>BLEE</sub>* han sido localizados en este tipo de elementos como es el caso de *bla<sub>CTX-M-17</sub>* (75).

Los plásmidos IncQ, cuyo prototipo es el plásmido RSF1010, se caracterizan por su amplio espectro de hospedador, que incluye bacterias gram-positivas, gram-negativas y *Archaea* (389, 419). Se transfieren eficientemente entre células con la ayuda de plásmidos de distintos grupos de incompatibilidad como IncI, IncM, IncX y sobre todo IncP. Algunos están implicados en fenómenos de retrotransferencia mediada por plásmidos de tipo IncP-1 (pQKH54) (179), lo cual refleja su importancia en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos entre distintos huéspedes bacterianos.

**Tabla 1.** Plásmidos conjugativos de diferentes grupos de incompatibilidad en *Enterobacteriaceae*

Grupo Incompatibilidad	Plásmidos	Tamaño (Kb)	Resistencia a antibióticos	Otros			Referencia
				marcadores fenotípicos <sup>R</sup>	Elementos identificados	Rango de hospedador	
<b>IncP1-α</b>	pTB11	68.8	Ap, Cf, Cfx, Gm, Km, Sp, Sm, Te, Tb, Tp	Tel	Tn402, integrón de clase I	<i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	455
	RK2, RP1, RP4	60	Ap, Amg, Te, Km	-	TnI	<i>P. aeruginosa</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	341
	pBS228	89.14	Blac, Sp, Sm, Te, Tp	Hg	TnI, Tn5718	<i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	178
<b>IncP1-β</b>	R751	53, 423	Tp	qacE	Tn4321	<i>E. coli</i>	459
					Tn402, Tn5053, IS1111	<i>E. aerogenes</i>	
	pB2, pB3	61-56	Pen, Blac, Te, Cm, Sp, Sm, Te, Su	qac, BrEt	Tn402- Integron clase I	Desconocida (aislado de organismos no cultivables)	193
	pB4	79.3	Blac, Eri, Sm, Rox	cromato	Tn5719, Tn5720, Tn5393c	<i>Pseudomonas sp.</i>	453
	pB8	57.2	Blac, Sp, Sm, Su	qacE, BrEt	Tn402-like Tn5501-like, Tn21/Tn501	Desconocida (aislado de organismos no cultivables)	416
	pB10	64.5	Blac, Sm, Su, Te	qac, Hg	Tn501-like Tn5393c	Desconocida (aislado de organismos no cultivables)	415
	pRSB111	47	Az, Cla, Eri, Rox, Ti		ISp415, TnI, IS6100	<i>Pseudomonas sp.</i>	448

Tabla 1. Cont.

Grupo Incompatibilidad	Plásmido	Tamaño (Kb)	Resistencia a antibióticos	Otros marcadores fenotípicos <sup>R</sup>	Elementos identificados	Rango de hospedador	Referencia
<b>IncP1-β</b>	PBP136(*)	41.2				<i>Bordetella pertussis</i>	186, 217
	pTP6	54.3		Hg	Tn5058	Desconocida (aislado de organismos no cultivables)	431
	pGNB1	60		<i>Tmr</i> , <i>lpaA</i>	Tn5501-like, IS1071	-	417
	pJP4	87.7		Hg, tld	Tn501, IS1071	<i>Ralstonia eutropha</i>	464
	pUO1	67		Hg, haloaceta to catabólico	TnHad1, TnHad2 (Tn21-like), Tn4671, Tn4672, Tn5053	<i>Delftia acidovorans</i>	435
	pADP-1	108.8		Hg, Az-C	Tn5053, Tn5041, IS1071	<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	278
<b>IncP-like</b>	pKJK5	54.4	Te, Tp	-	ISPa17, Tn402-like	<i>Escherichia, Kluyvera</i>	17
	pSB102	55.5		Hg	Tn5718, Tn2000	Desconocido	418
<b>IncN</b>	R46	50.9	Blac, Sp, Sm, Su, Te	Arsénico		<i>Enterobacteriaceae</i>	60
				Protección UV	In4, IS6100, IS26		
<b>IncA/C</b>	pIP1202		Blac, (Cel), (Cm),				
	pSN254,	158-183	(Ctr), (Gm), Sm, (Sp),	Hg, qacE	Tn21, Tn10	<i>Enterobacteriaceae</i>	490
	pYR1		Su, Te, (Tp)				



Tabla 1. Cont.

Grupo Incompatibilidad	Plásmido	Tamaño (Kb)	Resistencia a antibióticos	Otros			Referencia
				marcadores fenotípicos <sup>R</sup>	Elementos identificados	Rango de hospedador	
<b>IncL/M</b>	pCTX-M-3	89.5	Ap, Cef, Gm, Sm, Su, Tp		Integrón clase 1, ISECp1, IS26	<i>Enterobacteriaceae</i>	167
	pEL60	60	Ninguno	Ninguno	-	<i>Erwinia amylovora</i>	145
	pSEM	100	Ak, Cef, Gm, Km, Su	qac	Integrón clase 1, ISCR1	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	476
	pACM1	85	Blac, Amg, Su, Te, Tp	Hg	In4, IS6100	<i>Enterobacteriaceae</i>	382
	pCFF04	85	Ak, Km, Nt, Su, Tb, Te	-	Tn1-Tn21	<i>Enterobacteriaceae</i>	360
<b>IncFI</b>	pIP1204	90	Ap, Ctx, Sm, Su, Tp	-	-	<i>K. pneumoniae</i>	155
	IncFI/97	120	Ap, Cm, Km, Sm, Sp, Su, Te, Tp	Hg	Integrón de clase 1 IS1936	<i>S. enterica</i>	78
<b>IncFII</b>	R1	96	Ap, Cm, Km		Tn3	<i>S. enterica</i> serovar Paratyphi	
	R100, NR1	94	Cm, Sm, Su, Te		Tn21	<i>S. flexneri</i> , <i>E. coli</i>	309
	pRSB107	120	Ap, Cm, Eri, Km, Pn, Ne, Sm, Su, Te, Tp	Hg	Tn21, Tn10 IS26	<i>E. coli</i>	449
	pC15-1a	92	Ap, Cef, Cm, Gm, Tb		Tn1721, Tn21, Tn3 IS26	<i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i>	50
	p1658/97	125	Cm, Sm, Sp, Gm, Km, Te	Hg	IS1, IS26, IS100 Tn1, Tn21, Tn1721	<i>E. coli</i>	509

**Tabla 1.** Cont.

Grupo Incompatibilidad	Plásmido	Tamaño (Kb)	Resistencia a antibióticos	Otros		Referencia
				marcadores fenotípicos <sup>R</sup>	Elementos identificados	
<b>IncFII</b>	pU302L	84.5	Ap, Cm, Gm, Sm, Su, Te, Car, Eri	Hg, <i>mph</i>	Tn <i>SF1</i>	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium 104
<b>IncHII</b>	R27	180	Te		Tn <i>I0</i> , IS <i>I</i> , IS2, IS30 Tn2 <i>I</i> , Tn3926, Tn <i>I33I</i> ; Tn2680, Tn <i>I0</i> , IS <i>I328</i> , IS <i>I0</i> , IS432 <i>I</i>	<i>S. enterica</i> serovar Typhi 423
<b>IncHI2</b>	R478	274.8	Blac, Cm, Su, Sm, Te, Tp	Hg	IS26, Tn7, Tn <i>I0</i> , Tn2 <i>I</i>	<i>S. maricensis</i> <i>S. enterica</i> <i>E. coli</i> 164
	pK29	270	Cm, Km, Su, Tp	-	In4, <i>ter</i> , <i>ars</i> , <i>cop</i> , <i>sil</i> , <i>mer</i> , IS <i>Ehe3</i> , IS26, IS30, IS6100,	<i>K. pneumoniae</i> 107
	pAPEC-O1-R	241	Sm, Te, Gm, Su, Tp	Ag, Cu, Tel	IS5, IS26, IS6100, IS <i>Ecp1</i> , IS <i>I02</i> , IS <i>EC8</i>	<i>E. coli</i> 215
<b>IncI</b>	R64	120.8	Sm, Tet	ars	Tn5393, Tn <i>I0</i> , IS2, IS <i>I33</i> , IS <i>I0</i> , IS <i>p1</i>	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium 234
	R721	75	Tp		Tn7, IS <i>I50</i>	<i>E. coli</i> 234
<b>IncK</b>	R387	82	Cm, Sm			<i>S. flexneri</i> Nº acceso Genbank M93063

Tabla 1. Cont.

Grupo Incompatibilidad	Plásmido	Tamaño (Kb)	Resistencia a antibióticos	Otros marcadores fenotípicos <sup>R</sup>	Elementos identificados	Rango de hospedador	Referencia
IncW	pSa	35	Cm, Gm, Km, Sm, Sp, Su, Tb	qac	ISCR1,	<i>S. flexneri</i>	450
	R388, R7K, pIE522, pIE321	15-34	Cm, Gm, Km, Sm, Sp, Su, Tb	qac	Integrón de clase 1, Tn5393, TnI	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Stenotrophomonas</i>	14
IncT	RtsI	217	Km		IS610, IS611, Tn2680, Tn6901, Tn9199	<i>P. vulgaris</i>	303
IncX	R6K, R485	40	Ap, Sm			<i>E. coli</i>	Nº acceso a Genbank AJ006342, M11688
IncY	P1Cm	93	Cm			<i>E. coli</i>	454
IncU	pFBAOT6	84	Te	BrEt	Integrón clase I Tn1721, Tn3	<i>Aeromonas caviae</i>	392

(\*) Es considerado el precursor ancestral de los plásmidos IncP-1

Blac=β-lactámicos; Amg=aminoglicosidos; Ap=apramicina; Az=azitromicina; Car=carbenicilina; Cef=cefalosporinas; Cel=cefalotina; Cf=cefalor; Cfx=cefuroxima; Ctr=ceftriaxona; Cla=claritromicina; Cm=cloranfenicol; Eri=eritromicina; Gm=gentamicina; Km=kanamicina; Ne=neomicina; Nt=netilmicina; Pn=penicilina; Rox=roxitromicina; Sm=estreptomina; Sp=espectinomina; Su=sulfamidas; SXT=sulfametoxazol; Tel= telurito, Te=tetraciclina; Tb=tobramicina; Ti= tilosina; Tp=trimetoprim; Hg=Mercurio, qac= sales de amonio cuaternario; BrEt= bromuro de etidio; UV= luz ultravioleta; ars= arsénico

Las secuencias de los plásmidos siguientes están disponibles en la siguiente dirección [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub\\_p.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub_p.html). Incluyen pTB11 (NC\_006352); RK2 (BN000925); pBS228 (NC\_008357), pTP6 (NC\_007680); R751 de *Enterobacter aerogenes* (NC\_001735); pB3(NC\_006388); pB4 (NC\_003430); pB8 (NC\_007502); pB10 (NC\_004840); pRSB111(AM260957); pJP4 from *Ralstonia eutropha* (AY365053); pUO1 de *Delfia acidovorans* (NC\_005088); pADP-1 de *Pseudomonas* spp (NC\_004956); pKJK5 de *Escherichia coli* (NC\_008272); pSB102 (NC\_003122); R46 de *Salmonella enterica* Typhimurium (NC\_003292); pIP1202 de *Yersinia pestis* (NC\_009141); pCTX-M-3 de *Citrobacter freundii* (AF550415); pEL60 de *Erwinia amylovora* (NC\_005246); pHCM1 de *Salmonella enterica* CT18 (NC\_003384); pAPEC-O1-R de *Escherichia coli* APE01 (NC\_009838); pK29 de *Klebsiella pneumoniae* NK29 (EF382672); R64 de *Salmonella enterica* Typhimurium (NC\_005014); R721 de *Escherichia coli* (NC\_002525); pFBAOT6 de *Aeromonas punctata* (NC\_006143)

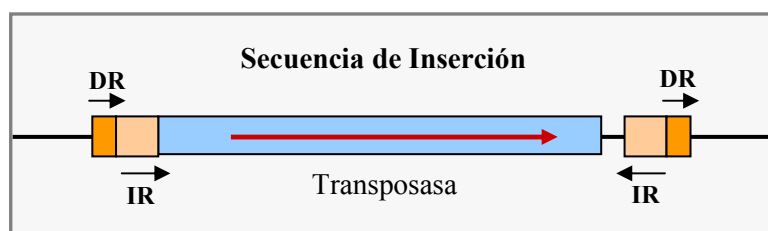
### 1.3.2. Transposones

Se han definido cuatro clases de transposones en enterobacterias en base a sus diferencias estructurales y su mecanismo de transposición: 1) transposones compuestos o transposones de clase I, 2) transposones de clase II, 3) transposones de la familia Tn5090-Tn7 y 4) transposones conjugativos, siendo las tres primeras clases las que se encuentran con mayor frecuencia en *Enterobacteriaceae*. En esta sección se revisarán las principales características de cada uno de los tipos de transposones así como las de las *secuencias de inserción* que forman parte de transposones (actuando directamente en la transposición) y de otros elementos como plásmidos e integrones (favoreciendo procesos de recombinación homóloga).

#### 1.3.2.1. *Secuencias de inserción*

Las *Secuencias de Inserción* (IS) están constituidas por secuencias cortas de ADN que codifican la síntesis de una transposasa responsable de la transposición (figura 3). Actualmente se han descrito más de 800 ISs correspondientes a 86 géneros bacterianos representativos de 196 especies de eubacterias y archaeae.

Las IS están implicadas en distintos mecanismos de transposición. El análisis funcional y bioinformático de estas enzimas ha permitido diferenciarlas en varias categorías. El grupo mayoritario se caracteriza por poseer una secuencia aminoacídica conservada de *tipo DDE* e incluye IS10, IS550, IS911 y las transposasas del bacteriófago Mu y de Tn7 (269). Otro grupo muestra similitud con enzimas asociadas a replicones que utilizan un mecanismo de replicación de círculo rodante como IS91 y ISCR1 (*rolling circle replication, RCR*) (158, 460). Las de la familia IS110, a la cual pertenecen ISEcP1, IS1111, e IS5075 parecen ser recombinasas sitio-específicas mientras que los sitios activos para IS1 o IS66, IS200 e IS605 no han sido identificados (269).



**Figura 3. Representación esquemática de una secuencia de inserción (IS).**  
DR= secuencia repetida directa; IR= secuencia repetida invertida.

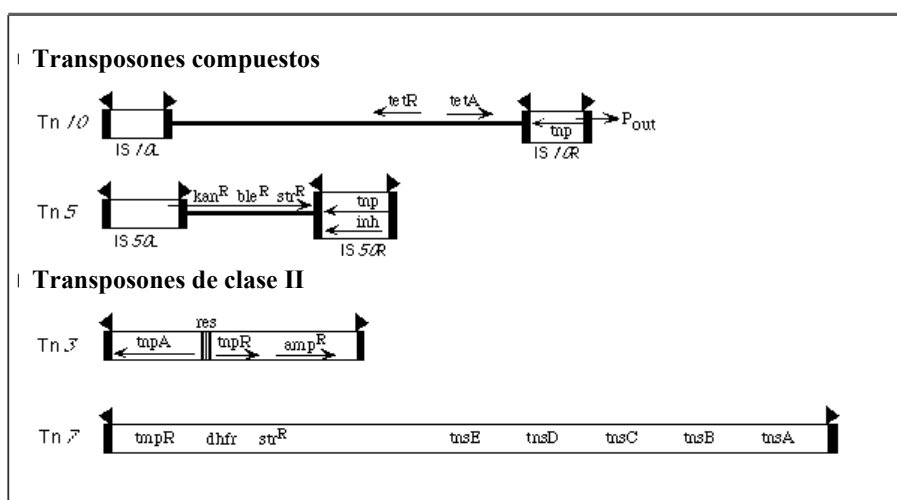
La información depositada en la base de datos ISfinder (<http://www-is.biotoul.fr/is.html>) demuestra la gran diversidad de ISs, su distribución y ubicuidad en plásmidos y genomas ya secuenciados. Actuando como secuencias homólogas repetitivas, estos elementos están implicados en deleciones, inversiones o reorganizaciones del genoma

bacteriano que tienen un gran efecto en su ensamblaje y en la clusterización de genes con funciones adaptativas como resistencia a antibióticos, virulencia o funciones catabólicas (30, 270). Además han sido relacionados con eventos de movilización de genes y transposones como Tn21 (IS4321, IS5075) y expresión de genes de resistencia que incluyen genes *bla*<sub>CTX-M</sub> (IS1, ISEcP1, ISCRI) y genes *bla*<sub>SHV</sub> del cromosoma de *K. pneumoniae* (IS26) entre otros (121, 132, 139, 144, 239, 241, 343, 372, 375, 460).

### 1.3.2.2. Transposones de clase I

Los *transposones de clase I* o los *transposones compuestos* consisten en dos copias de una secuencia de inserción (IS) con la misma o distinta orientación, que flanquean un número variable de genes con diferentes funciones principalmente resistencia a antibióticos o funciones catabólicas y que contribuyen a la transposición (32). La movilidad de estos elementos también está relacionada con su asociación a fagos o a plásmidos conjugativos, donde estos transposones se encuentran (335, 463).

Los ejemplos más representativos de transposones de clase I en *Enterobacteriaceae* son Tn5 (IS50, *kan*) y Tn1525 (IS15, *kan*) que confieren resistencia a kanamicina y Tn10 (IS10, *tet*) que confiere resistencia a tetraciclina (243, 309, 423). Recientemente, han sido también asociados a la diseminación de los genes *bla*<sub>PER-1</sub> (IS1387) y *bla*<sub>OXA-48</sub> (IS1999). Estos transposones compuestos se encuentran frecuentemente formando parte de estructuras más complejas que contienen transposones de clase II como Tn21 (Tn1525) o Tn5393 (IS1387-*bla*<sub>PER-1</sub>-IS1387) en diferentes especies de microorganismos Gram negativos (figura 4, 12, 90, 236, 274).



**Figura 4.** Representación esquemática de ejemplos clásicos de transposones compuestos y de transposones de clase II.

### 1.3.2.3. *Transposones de clase II*

Los transposones de clase II, los más prevalentes en *Enterobacteriaceae*, se caracterizan por la presencia de genes que codifican una transposasa y una resolvasa, y un segmento de ADN variable, todo ello flanqueado por dos IR (*inverted repeat*). Dentro de este grupo, se han definido dos sub-grupos dependiendo de la orientación de la transposasa (*tnpA*) y resolvasa (*tnpR*): i) los derivados de Tn3 (en los cuales transposasa y resolvasa se transcriben en dirección opuesta) y ii) los derivados de Tn21 (en los cuales esos genes se transcriben en la misma dirección) (173, 256).

Los *transposones tipo Tn3* constituyen un grupo heterogéneo ampliamente diseminado en bacterias Gram negativas y Gram positivas de origen diverso (humano, animal y medioambiental) cuyo máximo representante es Tn3 (173). Los transposones de este grupo son responsables de la diseminación de diferentes variantes de tipo *bla*<sub>TEM</sub> (*bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>TEM-2</sub>, *bla*<sub>TEM-3</sub>, *bla*<sub>TEM-52</sub> o *bla*<sub>TEM-135</sub>). Otros derivados de Tn3 están asociados a transposones de clase I o integrones que contienen otras  $\beta$ -lactamasas como *bla*<sub>PER-1</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub>, respectivamente, dando lugar a fenotipos de multiresistencia (345, 350, 488). Son los casos de las islas genéticas formadas por Tn5393d (*strA-strB*, *aphA6b*) y *bla*<sub>PER-1</sub> resistentes a  $\beta$ -lactámicos, estreptomicina y aminoglucósidos, y la integrada por *bla*<sub>VIM-2</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-9</sub>, *aadA1* y *aacA4* en Tn1332, que confiere resistencia a  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos (274, 374). En general, la identificación de plataformas modulares complejas que incluyen transposones de distintas clases/subgrupos (Tn3, Tn1721, Tn21, Tn1696, Tn5393), e integrones parece ser un fenómeno frecuente que ha influenciado la evolución de los plásmidos de distintos grupos de incompatibilidad como IncFII, IncW o IncHI2 (265, 322, 344, 350, 391, 444).

Los *transposones mercuriales* son derivados de Tn3 muy diseminados en la naturaleza en un amplio rango de bacterias gram negativas y gram positivas, cuya evolución está influenciada por fenómenos de transferencia horizontal y de recombinación homóloga (43, 336). Se caracterizan por conferir resistencia a mercurio debido a la presencia de un operon *mer* que permite detoxificar este metal. Se han identificado distintas familias de transposones mercuriales como Tn501, Tn5036, Tn5061, Tn5062 y Tn5039, Tn5044 y Tn5070 (226, 256, 294, 295, 508). Otros transposones mercuriales pertenecientes a líneas evolutivas diferentes son Tn5053 (cuyo módulo de transposición es similar al de Tn402), Tn5041 y Tn5042 (227, 228, 293, 295). El éxito de los elementos de este grupo en bacterias de relevancia clínica ha sido atribuido a la adquisición de integrones y transposones como se ha mencionado anteriormente (256, 344). Esas estructuras mosaico constituyen elementos con una gran plasticidad, estando su evolución determinada por eventos de recombinación homóloga o sitio-específica y por eventos de transferencia horizontal, originando ocasionalmente la formación de transposones recombinantes (294, 322, 344, 508).

#### 1.3.2.4. Transposones de la familia Tn5090-Tn7

Esta familia engloba el transposon mercurial Tn5090, los transposones asociados a integrones de clase 1 (Tn402), y de clase 2 (Tn7) descritos en bacterias Gram negativas, Tn552 de *Staphylococcus aureus* y el fago Mu (228a). Su módulo de transposición está formado por cuatro proteínas (TniABQR en Tn402 y Tn5053 o TniABCD en Tn7). Se caracterizan por un mecanismo de transposición replicativa en dos pasos que incluye la formación de cointegrados y su resolución en un sitio *res*. Se diferencian de los transposones Tn3 en que la formación de cointegrados requiere la acción de varios genes en lugar de uno solo (228a).

#### 1.3.2.5. Transposones conjugativos

Los transposones conjugativos (CTn) engloban elementos genéticos muy diversos que también se conocen como “elementos integrativos-conjugativos” (*integrative and conjugative elements*, ICEs) o “elementos conjugativos-autotransmisibles-integrativos” (*conjugal, self-transmissible, integrating elements*, CONSTINs), que describen su capacidad de auto-transferencia e integración en el cromosoma bacteriano y menos frecuentemente, en plásmidos (para revisión consultar 64, 65, 66, 301, 413). Los CTn han sido implicados en la diseminación de *resistencia a antibióticos*, principalmente tetraciclina y macrólidos. Se han identificado en una gran variedad de microorganismos Gram positivos y Gram negativos aunque su frecuencia es mucho mayor entre los primeros.

El representante más emblemático de este grupo es Tn916 (confiere resistencia a tetraciclina), inicialmente identificado en *Enterococcus faecalis* y posteriormente en *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* (394). Los CTn son menos frecuentes en enterobacterias aunque han sido estudiados detalladamente por sus implicaciones epidemiológicas como es el caso de SXT de *Vibrio cholerae* y también de R391 de *Providencia rettgeri* o R997 de *P. mirabilis* identificados en Suráfrica en 1967, y los cuales fueron inicial y erróneamente clasificados como plásmidos IncJ (27, 28, 44, 63, 335). El elemento SXT contiene diversos determinantes de resistencia a antibióticos o a metales y se ha identificado en bacterias de origen clínico y medioambiental de varias áreas geográficas, especialmente en el sudeste de Asia (tabla 2, 64, 66). Otros CTn incluyen genes adaptativos, como la capacidad de utilizar la sacarosa (Ctnscr94, detectado en *Salmonella enterica* Senftenberg) o de degradar compuestos aromáticos (Tn4371 descrito en *Ralstonia* sp o *bph-sal* detectado en *Pseudomonas putida*) (tabla 2, 195, 290, 317). Finalmente, se han descrito CTns en bacterias gram negativas anaerobias, especialmente *Bacteroides* spp., siendo los ejemplos más representativos CtnDOT o TC<sup>+</sup>ERL que confieren resistencia a tetraciclina y eritromicina y que también se encuentran ampliamente diseminados (492).



Las *islas de patogenicidad* son consideradas ICEs defectivos debido a la pérdida de la capacidad de movilización, salvo algunas excepciones como la SGI1 de *Salmonella* (127, 254). Se han descrito diferentes islas de patogenicidad en enterobacterias que incluyen SGI1 y SGI2 de *Salmonella*, ICE*kpl* de *K. pneumoniae*, ICE*Ec1* de *E. coli* y HPI de *Yersinia* (127, 258, 421, 420). Los ICEs comparten normalmente los mismos sitios de integración, lo que aumenta la variabilidad de los mismos, bien entre bacterias de la misma o de distinta especie (64). La estructura modular de estos elementos facilita la adquisición y/o intercambio de módulos entre diferentes tipos y favorece la adaptación a distintos nichos ecológicos de los miembros de *Enterobacteriaceae* (258, 335, 355, 395, 463).

La amplia distribución de este tipo de estructuras, como SXT en *V. cholerae*, CtnDOT en *Bacteroides* spp. y las islas de patogenicidad SGI1 y SGI2 en *Salmonella* spp., han contribuido a la diseminación de complejos clonales específicos en determinadas áreas geográficas (161, 196). Debido a la influencia que han ejercido sobre la selección de diferentes microorganismos se conocen también como islas de epidemidad.

Se han descrito otros tipos de transposones, como los transposones movilizables (MTNs), que contienen un sitio *oriT* y genes *mob*, y cuya movilización se realiza mediada por un plásmido conjugativo presente en la misma célula. Estos elementos son especialmente comunes en *Bacteroides* sp. (335).

**Tabla 2.** Distribución y diversidad de transposones conjugativos y movilizables en bacterias Gram negativas.

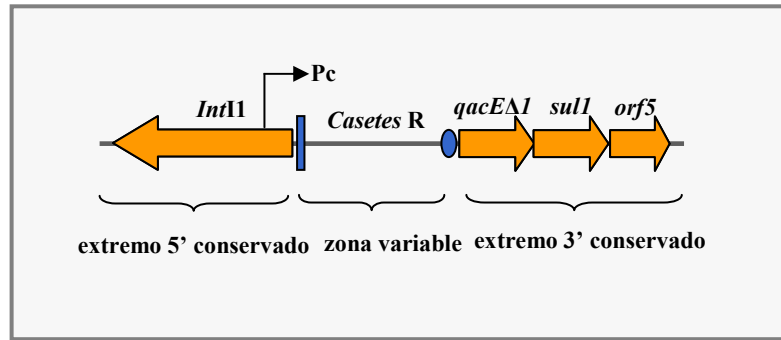
Nombre	Hospedador	Tamaño (kb)	Fenotipo <sup>a</sup>	Referencia
<b>A. Elementos Integrativos y Conjugativos (ICEs)</b>				
CTnscr94	<i>S. enterica</i> senftenberg	100	utilización sacarosa	195
	<i>Yersinia</i> spp., <i>E. coli</i> ,			62
HPI	<i>Klebsiella</i> spp., <i>Citrobacter diversus</i>	35-45	biosíntesis sideróforo	420
				15
ICEEc1	<i>E. coli</i>	35	biosíntesis sideróforo	421
ICEKp1	<i>K. pneumoniae</i>	76	biosíntesis sideróforo viscosidad del moco	258
SPI-7	<i>S. enterica</i> Typhi	134	antígeno Vi (cápsula)	364
SXT	<i>V. cholerae</i>	100	Su <sup>R</sup> Tm <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup>	27
pJY1	<i>V. cholerae</i>	NI	Su <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup>	506
R391	<i>P. rettgeri</i>	89	Km <sup>R</sup> Hg <sup>R</sup>	44
R997	<i>P. mirabilis</i>	85	Ap <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> Su <sup>R</sup>	354
<b>B. Elementos Integrativos y Movilizables (IMEs)</b>				
SGI1	<i>S. enterica</i>	43	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Ff <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> ,	127
	<i>P. mirabilis</i>		Su <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	2

<sup>a</sup>Ap=ampicilina; Cm=cloranfenicol; Ff=fluorfenicol; Hg=mercurio; Km=kanamicina; Sm=estreptomicina; Su=sulfametoxazole; Tc=tetraciclina; Tm= trimetoprim.

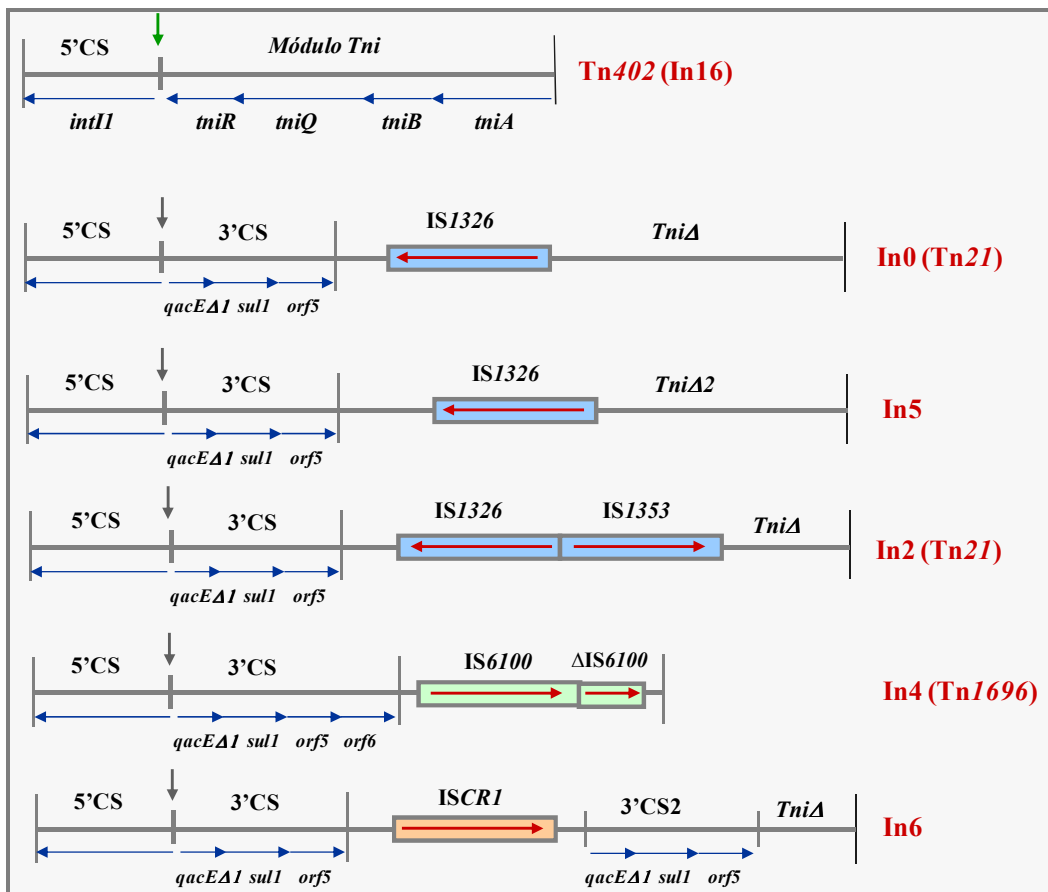
### 1.3.3. Integrones

Los integrones son sistemas de recombinación sitio-específica, a través del cual ocurre el reconocimiento, la captura, y la expresión de *cassetes o gene cassettes*, elementos móviles que consisten en un gen carente de promotor (típicamente de resistencia a antibióticos o desinfectantes) y un sitio de recombinación específico denominado *attC* o elemento de 59 pb, (141, 182, 390). Los integrones se componen de tres elementos esenciales localizados en una región conservada denominada “5'-conserved region” (5'-CS): i) el gen *int* que codifica para una integrasa de la familia de las tirosina-recombinasas, ii) un sitio primario de recombinación (*attI*) y iii) un promotor (Pc), que asegura la expresión de los *genes cassettes*. Algunos tipos de integrones presentan una región 3'CS (3'-conserved region), constituida por un gen de resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*qacEΔI*), un gen de resistencia a sulfamidas (*sulI*) y una secuencia de función desconocida (*orf5*) (figura 5, 141). Una gran variedad de *gene cassettes* ha sido descrita. Su localización y su número dentro de los integrones es muy variable debido a deleciones, reorganizaciones o inserciones (figura 5, 141, 409). Los integrones no están dotados de movilidad, sino que se asocian a secuencias de inserción, transposones y/o plásmidos conjugativos, que permiten su transmisión intra e intercelularmente (256, 286, 446).

Se han identificado cinco clases de integrones asociadas a la diseminación de genes de resistencia en *Enterobacteriaceae*, que difieren entre sí en las secuencias de sus integrasas (409). Los integrones de clase 1 son los más frecuentemente encontrados en bacterias resistentes a antibióticos en el ámbito intra y extrahospitalario, son derivados defectivos de Tn402 que están asociados frecuentemente a disitintos transposones de la familia Tn3 (Tn21, Tn1, Tn3) (141, 286). Los integrones de clase 2 están relacionados exclusivamente con la familia Tn7 (387, 446). Los integrones de clase 3 son similares a los de clase 2 y están asociados a transposones en plásmidos conjugativos (91, 98). Los integrones de clase 4 son componentes del elemento SXT encontrado en *V. cholerae*, que contiene genes que confieren resistencia a sulfametoxazol, trimetoprim y estreptomicina (196). Los integrones de clase 5 se han identificado en un transposón compuesto localizado en un plásmido de *Vibrio salmonicida* (número de acceso Genbank accession number AJ277063).



**Figura 5. Representación esquemática de un integrón.** Estas estructuras se componen de dos regiones conservadas (extremos 5'CS y 3'CS). *Int11* representa el gen de la integrasa, *qacEΔ1* y *sul1* genes que confieren resistencia a compuestos de amonio cuaternario y sulfamidas respectivamente y *orf5* tiene función desconocida. La región variable puede contener distintos *gene cassettes*. *Pc* representa el promotor que dirige la expresión de estos genes.



**Figura 6. Integrones de clase 1 derivados de Tn402.** Representación de distintos tipos de integrones de clase 1 derivados de Tn402, que difieren en el contenido de diferentes secuencias de inserción (IS1326, IS1353, IS6100, ISCR1). La flecha verde representa la inserción de ISs, mientras que las flechas grises indican la inserción de *gene cassettes*. Adaptado de Partridge y col., 2001.

Los integrones más frecuentes son los de clase 1, diseminados ampliamente entre las especies de la familia *Enterobacteriaceae* (7, 141, 251, 252, 280), *V. cholerae* y *P. aeruginosa* (175, 426,) y menos frecuentemente, en bacterias Gram positivas (310, 503).

Los integrones de clase 1 son derivados defectivos de Tn402 que pueden clasificarse según la presencia y tipo de secuencias de inserción localizadas en el extremo terminal de la región 3'CS, truncando el módulo *tni* (IS1326 y/ó IS1353 se asocian con la línea del In0-In2-In5-In31 e IS6100 con la línea del In4) (figura 6, 61, 347). Estos derivados de Tn402 están frecuentemente relacionados con transposones mercuriales de distintos tipos según la especie implicada, Tn21/Tn1696 en enterobacterias y Tn501/Tn5051 en *Pseudomonas* (346, 461). Algunos genes *bla* están localizados en integrones bien como *gene cassettes* dentro de su parte variable 5'CS-3'CS (*bla*<sub>VIM-2</sub>, *bla*<sub>VEB</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>) o como genes asociados río abajo a *ISCR1* (*bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>) de integrones que se caracterizan por una duplicación de la región 3'-CS y una región que incluye *ISCR1* (inicialmente conocida como orf513 o CR1, conserved region). Algunos de estos integrones inusuales con *ISCR1* son In6, In7, In8, In60 e In35 (8, 151, 237, 267, 306, 410, 442, 471, 475).

La variabilidad de los *gene cassettes* que componen los integrones (implicados en resistencia a antibióticos, virulencia o funciones metabólicas) y de las estructuras dónde se localizan indica que estos elementos, que parecen haber tenido origen en los superintegrones, contribuyen a la flexibilidad del genoma y a la adaptabilidad bacteriana (141, 142, 286, 409). Algunos estudios han demostrado la estabilidad y persistencia de integrones a lo largo del tiempo, indicando que deben estar sometidas a selección positiva (266, 280).

#### 1.4. Resistencia a antibióticos en *Enterobacteriaceae*

La aparición y rápida diseminación de resistencia a agentes biocidas (agentes antimicrobianos, detergentes y antisépticos) entre los aislados de la familia *Enterobacteriaceae* de origen humano y animal en las últimas décadas ha originado la aparición de cepas resistentes a la mayoría de los fármacos disponibles, limitando las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones graves causadas por estos microorganismos (149, 260, 261). Los fenotipos de resistencia a diferentes familias de antibióticos reflejan la presencia de diferentes genes, frecuentemente localizados en elementos genéticos comunes (335, 351, 352).

### 1.4.1. Resistencia a antibióticos $\beta$ -lactámicos

Desde su introducción en la práctica clínica en 1940, los antibióticos  $\beta$ -lactámicos representan los agentes antimicrobianos más utilizados tanto en el ámbito intra- como extrahospitalario (3, 20). Esta clase de antibióticos incluye las penicilinas, las cefalosporinas, los carbapénemicos y los monobactámicos, que se caracterizan por la presencia de un anillo  $\beta$ -lactámico en su estructura, que inhibe la transpeptidasa bacteriana, conocida también como PBP (*penicillin binding protein*) que participa en la síntesis de peptidoglucano, necesario para la formación de la pared celular (282). Han sido descritos diversos mecanismos de resistencia a este grupo de antibióticos (alteraciones de porina, sistemas de eflujo, alteraciones en las PBP y/o producción de enzimas capaces de degradar el antibiótico), siendo el más común la producción de enzimas conocidas como  $\beta$ -lactamasas (288, 380, 457). La producción de penicilinas se detectó por primera vez en *Staphylococcus aureus* y las cepas resistentes se diseminaron muy rápidamente. Algo análogo ocurrió con la  $\beta$ -lactamasa TEM-1 en bacterias Gram-negativas, que se diseminó rápidamente en *E. coli* o *Haemophilus influenzae*, constituyendo actualmente el mecanismo de resistencia más importante en bacterias Gram-negativas, donde se encuentra altamente diversificada y ampliamente distribuida (1, 143, 262, 351, 352).

Se han propuesto diferentes esquemas de clasificación de  $\beta$ -lactamasas en función de la estructura molecular y de la función de la proteína. La primera clasificación funcional basada en el espectro y perfil de sustrato fue propuesta por Richmond y Sykes en 1973 (396). En 1991, Ambler propuso una clasificación basada en la secuencia aminoacídica de la proteína, que es la más utilizada (4, 5). Posteriormente, estas clasificaciones fueron modificadas según el perfil de inhibición por inhibidores de  $\beta$ -lactamasas por *Bush-Jacoby-Medeiros* en 1995 (tabla 3, 67, 69). El sistema de clasificación de *Ambler* propuesto en 1991 se basa en

- a) Clasificación de Ambler. Distingue 4 clases de enzimas (A, B, C y D). Las  $\beta$ -lactamasas de clase A, clase B ó clase C se caracterizan por la presencia del aminoácido serina en el sitio activo; las de clase D requieren la presencia de  $Zn^{2+}$  para su actividad (4).
- b) Clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. Distingue los siguientes cuatro grupos (67, 69):
  - i) Grupo 1 (correspondiente a la clase C de Ambler). Incluye enzimas codificadas por genes cromosómicos y/o plasmídicos con actividad cefalosporinasa que no son inhibidas por inhibidores de  $\beta$ -lactamasas.

- ii) Grupo 2 (correspondiente a las clases A y D de Ambler). Es un grupo heterogéneo de enzimas de amplio espectro de sustrato (penicilinasas, cefalosporinasas, oxacilinasas y carbapenemasas) inhibidas por inhibidores clásicos de  $\beta$ -lactamasas. Se divide en diferentes sub-grupos, uno de los cuales (2be) incluye las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE).
- iii) Grupo 3 (correspondiente a la clase B de Ambler). Incluye enzimas que requieren  $Zn^{2+}$  para su actividad (metalo- $\beta$ -lactamasas) y que son inhibidas por agentes quelantes como EDTA. La localización de los genes codificantes de las  $\beta$ -lactamasas de clase B puede ser cromosómica o plasmídica. A diferencia de otras carbapenemasas, las de éste grupo no son inhibidas por el ácido clavulánico y no hidrolizan monobactámicos.
- iv) Grupo 4. Agrupa enzimas no inhibidas por el ácido clavulánico y que no se incluyen en las otras categorías.

#### 1.4.1.1. Las $\beta$ -lactamasas de espectro extendido

La designación de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) fue inicialmente propuesta por Philippon *y col.* en el año 1989 (362) para enzimas codificadas por plásmidos que hidrolizaban cefalosporinas de primera (cefalexina, cefalotina, cefazolina), segunda (cefaclor, cefuroxima), tercera (cefotaxima, ceftazidima, cefixima y ceftriaxona), cuarta generación (cefepima y cefpiroma), y monobactámicos (aztreonam). Los carbapenémicos (imipenem y meropenem) y las cefamicinas (cefoxitina) no se ven afectadas. Estas enzimas son inhibidas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.

Las BLEE se clasifican en diferentes tipos en función de su secuencia aminoacídica siendo las enzimas de clase A de las familias TEM, SHV, CTX-M y las enzimas de clase D tipo OXA las más frecuentemente identificadas en *Enterobacteriaceae*, principalmente entre las especies *K. pneumoniae* y *E. coli*. Otros tipos menos frecuentes son PER, VEB, GES, TLA o IBC que parecen estar confinadas a determinadas zonas geográficas (tabla 4, 98, 305, 308, 353, <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>).

La primera descripción de BLEE ocurrió en 1983 con la identificación de BLEE de tipo SHV (derivada de la clásica SHV-1), seguida del aislamiento en 1984 de enzimas de tipo TEM (derivada de la clásica TEM-2) y en 1986-1989 de tipo CTX-M (25, 283). La expresión de estas enzimas se ha visto incrementada debido a su asociación con diferentes promotores eficientes. Además, la localización de los correspondientes genes *bla* en plásmidos facilita su transferencia y persistencia en una población bacteriana (353, 377). No es infrecuente la producción de más de un tipo de BLEE por un determinado microorganismo (151, 207, 407).

**Tabla 3.** Clasificación de  $\beta$ -lactamasas (adaptado de la referencia 69).

Bush Jacoby Medeiros	Ambler	Sustrato preferencial	Inhibidos por		Localización del gen	$\beta$ -lactamasas representativas	Microorganismos
			CLV <sup>a</sup>	EDTA			
<b>1</b>	<b>C</b>	Cefalosporinas	-	-	Crom <sup>b</sup> PI <sup>b</sup>	AmpC MIR-1, ACC-1, FOX, CMY, LAT, MOX-1, MOX-2, DHA-1, ACT-1, CFE-1	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
<b>2a</b>	<b>A</b>	Penicilinas	+	-	Crom/PI	Penicilinas bacterias Gram positivas	<i>S. aureus</i>
<b>2b</b>	<b>A</b>	Penicilinas Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> generación	+	-	PI	TEM-1, TEM-2, SHV-1	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
<b>2be</b>	<b>A</b>	Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> -4 <sup>a</sup> generación monobactámicos	+	-	PI Crom	<b>BLEE<sup>c</sup></b> : TEM-(3-160), SHV-(2- 100), CTX-M-(1-75), PER-(1-3), VEB-(1-5), SFO-1, BES-1, GES, IBC, TLA-1 K1 de <i>K. oxytoca</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>K. oxytoca</i>
<b>2br</b>	<b>A</b>	Penicilinas Inhibidores $\beta$ -lactamasas	+/-	-	PI	IRT (TEM-30-36, TEM-38-40, TEM-44, TEM-45, TEM-51, TEM- 59, TEM-65)	<i>Enterobacteriaceae</i>
<b>2c</b>	<b>A</b>	Penicilinas, carbenicilina	+	-	PI	PSE-1, PSE-3, PSE-4	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
<b>2d</b>	<b>D</b>	Penicilinas, cloxacilina	+/-	-	PI	OXA-1-11, PSE-2 (OXA-10)	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
<b>2de</b>	<b>D</b>	Penicilinas, cloxacilina Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> -4 <sup>a</sup> generación	+/-	-	PI	<b>BLEE</b> : derivados OXA-10	<i>P. eruginosa</i>
<b>2e</b>	<b>A</b>	Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> -4 <sup>a</sup> generación	+	-	Crom	Cefuroximas	<i>P. vulgaris</i>
<b>2f</b>	<b>A</b>	Penicilinas, cefalosporinas 1 <sup>a</sup> -3 <sup>a</sup> generación, carbapenemos	+	-	Crom	IMI-1 NMC-A, SME-(1-3), KPC-(1-3), GES-2	<i>E. cloacae</i> , <i>S. marcescens</i>



Tabla 3. Cont.

Bush Jacoby Medeiros	Ambler	Sustrato preferencial	Inhibidos por	Localización del gen	β-lactamasas representativas	Microorganismos
3	B	Penicilinas, cefalosporinas 1 <sup>a</sup> -3 <sup>a</sup> generación, carbapenemos	-	Crom Crom/Pl Pl	L1 CcrA IMP, VIM, GIM-1, SPM-1, SIM-1	<i>S. maltophilia</i> <i>Bacteroides grupo fragilis</i> <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
4	nd	Penicilinas	-	Crom Pl	SAR-2	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>E. coli</i>

<sup>a</sup> CLV = ácido clavulánico; <sup>b</sup> Pl= plásmido; Crom= cromosoma; <sup>c</sup> β-lactamasa de espectro extendido (BLEE).

**Tabla 4.** Origen de los distintos tipos de BLEE

BLEE	Ambler	Beta-lactamasa relacionada	País de emergencia	Especie donde se detectó por primera vez	Referencia
<b>Alta prevalencia</b>					
SHV	A	SHV-1/LEN (>90%) <sup>a</sup>	Alemania (1983) <sup>b</sup>	<i>Enterobacteriaceae</i>	232
TEM	A	TEM-1, -2 (>90%) <sup>a</sup>	Francia (1985) <sup>b</sup>	<i>Enterobacteriaceae</i>	430
Grupo CTX-M-1	A	KLUC <i>Kluyvera cryocrescens</i> (85%) <sup>a</sup>	Alemania (1989) <sup>c</sup>	<i>E. coli</i>	25
Grupo CTX-M-2	A	KLUA <i>Kluyvera ascorbata</i> (80-100%) <sup>a</sup>	Japón (1986) <sup>3</sup> / Argentina (1989) <sup>c</sup>	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp.	26 283
Grupo CTX-M-8	A	KLUG <i>Kluyvera georgiana</i> (95%) <sup>1</sup>	Brasil (1996-97) <sup>c</sup>	<i>Citrobacters amalonaticus</i> <i>Enterobacter</i> spp.	47
Grupo CTX-M-9	A	KLUG <i>Kluyvera georgiana</i> (80%) <sup>a</sup>	España (1994) <sup>c</sup>	<i>E. coli</i>	411
Grupo CTX-M-25	A	NI	Canadá (2000) <sup>c</sup>	<i>E. coli</i>	302
OXA	D	OXA-10 (PSE-2) (>90%) <sup>a</sup>	Turquía (1991) <sup>c</sup>	<i>P. aeruginosa</i>	181
PER	A		Francia (1991) <sup>c</sup>	<i>P. aeruginosa</i>	318
VEB	A	PER (39%) <sup>a</sup>	Francia (Vietname) <sup>4</sup> (1996) <sup>c</sup>	<i>E. coli</i>	379
<b>Baja prevalencia</b>					
SFO	A	AmpA <i>Serratia fonticola</i> (96%) <sup>a</sup>	Japón (1988) <sup>c</sup>	<i>E. cloacae</i>	284
TLA	A	CME-1 (50%) <sup>a</sup> <i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	Méjico (1991) <sup>c</sup>	<i>E. coli</i>	427
BES	A	YENT (51%) <sup>a</sup> <i>Y. enterocolitica</i>	Brasil (1996) <sup>c</sup>	<i>S. marcescens</i>	46
GES-1	A	YENT (36%) <sup>a</sup> <i>Y. enterocolitica</i>	Francia (Guiana Francesa) <sup>d</sup> (1998) <sup>c</sup>	<i>K. pneumoniae</i>	371
IBC	A	YENT (40%) <sup>a</sup> <i>Y. enterocolitica</i>	Grecia (1999) <sup>c</sup>	<i>E. cloacae</i>	163
BEL	A	GES-1 (50%) <sup>a</sup>	Bélgica (2004) <sup>c</sup>	<i>P. aeruginosa</i>	373

<sup>a</sup> Homología de secuencias aminoácidas (%); <sup>b</sup> Fecha de publicación; <sup>c</sup> Fecha de aislamiento; <sup>d</sup> Origen del paciente en el cual la enzima correspondiente se detectó por primera vez; NI: No identificado.

### ***Enzimas de tipo TEM***

Las enzimas de tipo TEM presentan un espectro de actividad variable frente cefotaxima o ceftazidima debido a la presencia de algunas mutaciones específicas. Su designación deriva del nombre del primer paciente donde se aislaron (TEM-1, Temoniera). Todas las TEM descritas son variantes de TEM-1 y TEM-2, siendo TEM-1 una de las  $\beta$ -lactamasas más frecuentes en *Enterobacteriaceae* y responsable de aproximadamente 90% de la resistencia a ampicilina en *E. coli* (52), aunque su origen se desconoce. Tal y como otras  $\beta$ -lactamasas, debe originarse evolutivamente en proteínas codificadas cromosómicamente que fijan penicilina, como las PBPps (103, 144, 232, 430). Las enzimas IRT (Inhibitor Resistant TEM) son variantes con reducida afinidad por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, pero sin actividad frente a cefalosporinas de tercera generación (101). La aparición de mutaciones puede comprometer la actividad de cefalosporinas de amplio espectro y de inhibidores de  $\beta$ -lactamasas simultáneamente, dando lugar a las CMT (Complex Mutant TEM) (73a, 400).

Aunque las  $\beta$ -lactamasas tipo TEM son más frecuentes en *E. coli* y *K. pneumoniae*, también se encuentran distribuidas en muchas otras especies de *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (38, 48, 109, 143, 357; 365), habiendo algunas de ellas sido implicadas en epidemias clonales como TEM-4, TEM-21, TEM-24 o TEM-68 (10a, 48, 129, 140). La diseminación de enzimas de tipo TEM está asociada a la dispersión de derivados del transposón Tn3, eventualmente localizados en plataformas modulares y generalmente asociados a plásmidos. Algunos de ellas están altamente diseminadas de forma global como TEM-3, TEM-4, TEM-24, TEM-27 y TEM-52 (87, 95, 248, 298, 350, 360).

### ***Enzimas de tipo SHV***

Las enzimas de tipo SHV presentan también un espectro de actividad variable frente a cefotaxima o ceftazidima debido a la presencia de mutaciones en posiciones específicas (52). Su designación deriva de la presencia de un grupo sulfhidrilo (*sulphydryl variable*), en base a su afinidad por el compuesto para-cloromercuriobenzoato (PCMB) (285). Los miembros de este grupo son variantes de SHV-1 y parecen haber sufrido una menor diversificación en comparación con las enzimas de tipo TEM. Las enzimas de tipo SHV podrían haber tenido origen en LEN-1, una penicilinasa cromosómica de *K. pneumoniae*, con la cual SHV-1 presenta un 97.5% de homología. La movilización del gen correspondiente a plásmidos y/o elementos transponibles puede haber sido mediada por IS26 (103, 177).

La enzima SHV-1 y sus derivadas se encuentran con más frecuencia en *K. pneumoniae*, aunque se hayan diseminado vía plásmidos a muchas otras especies de *Enterobacteriaceae* (468), *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. (370). Como en el caso de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, la

diseminación de genes *bla<sub>SHV</sub>* está facilitada por su asociación con plásmidos conjugativos, que contienen frecuentemente otros determinantes de resistencia (190).

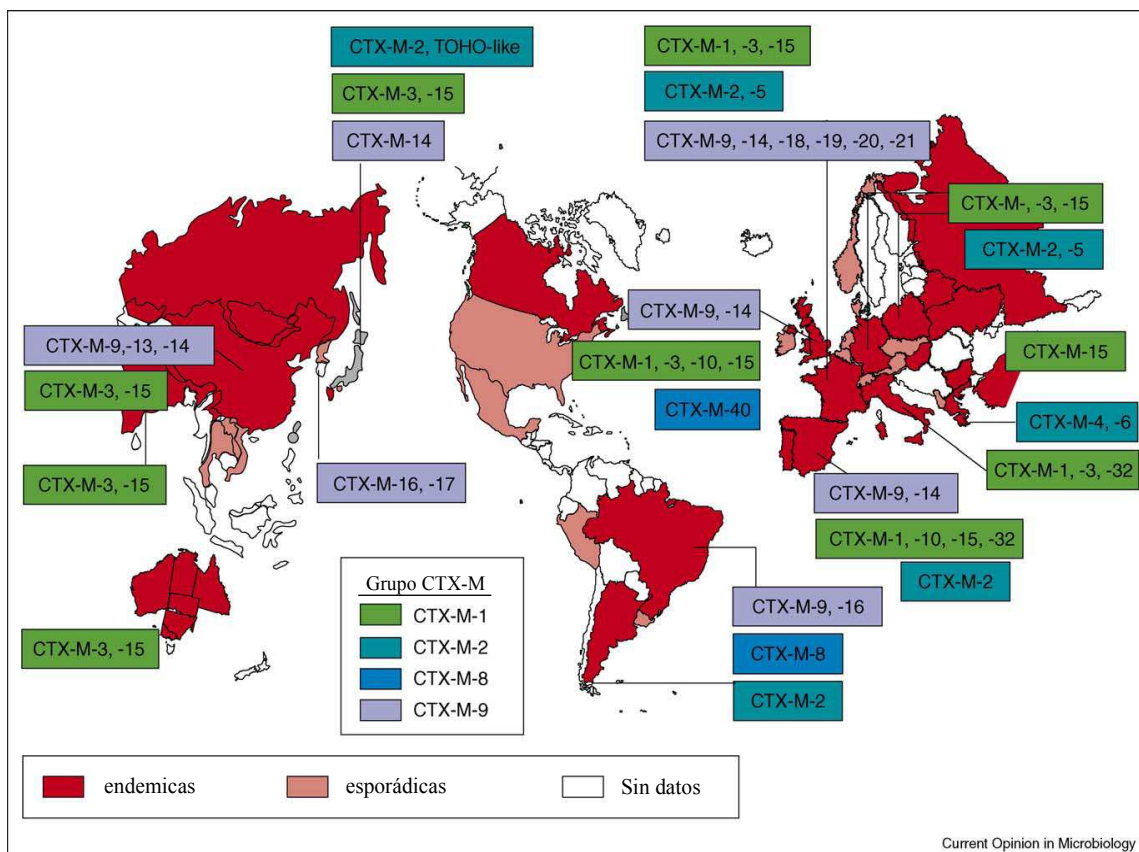
El primer enzima de amplio espectro que se describió fue SHV-2 en Alemania y pronto se diseminó en Estados Unidos y en los países mediterráneos (29, 232), aunque también SHV-5 presenta una distribución geográfica muy amplia y se haya asociado a plásmidos epidémicos multiresistentes previamente descritos (57, 370, 383). En la actualidad, la variante más frecuentemente aislada es SHV-12, inicialmente diseminada en Corea y Tailandia (102, 229), pero ampliamente detectada en Europa, particularmente en el ambiente extrahospitalario (296, 358, 473).

### ***Enzimas de tipo CTX-M***

Las enzimas de tipo CTX-M poseen un mayor poder hidrolítico frente a cefotaxima, razón por la cual fueron designadas cefotaximasas (45). Estas variantes parecen tener un origen en genes cromosómicos de bacterias medioambientales (*Kluyvera* sp.), habiendo sido identificadas distintas especies como posibles ancestros de los diferentes genes de los clusters de esta familia (*Kluyvera cryocrescens* y *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *Kluyvera ascorbata* y *bla<sub>CTX-M-9</sub>* y *Kluyvera georgiana* y *bla<sub>CTX-M-2</sub>*) (118, 330, 403). La movilización de estos genes a bacterias de origen clínico parece haber ocurrido por la acción de unidades de captura génica, como *ISEcPI*, *ISCRI* o secuencias relacionadas con fagos (329, 377, 460).

Se han descrito hasta la fecha más de 70 enzimas que se agrupan en 5 familias distintas en función de la homología de las respectivas secuencias aminoacídicas: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>). Actualmente constituyen las  $\beta$ -lactamasas más diseminadas en todo el mundo, tanto en el medio intra como extra-hospitalario, considerándose endémicas en Sudamérica, Europa mediterránea, Europa de Este y Asia (figura 7, 74, 263, 408). En España, representan en la actualidad un 75% del total de BLEE detectadas, siendo las más frecuentes las de los grupos CTX-M-9 (CTX-M-9 y -14) y CTX-M-1 (CTX-M-1, -10, -15 y -32). Estas enzimas son preferencialmente aisladas en *E. coli* (191, 299, 329).

Su asociación a elementos móviles como integrones, plásmidos y/o transposones ha permitido su diseminación y persistencia a lo largo del tiempo (74, 132, 239, 329, 412).



**Figura 7.** Distribución mundial de enzimas de tipo CTX-M (adaptado de la referencia 74).

#### 1.4.1.2 Otras $\beta$ -lactamasas con importancia clínica

Las  $\beta$ -lactamasas de tipo OXA (clase D según el esquema de Ambler) tienen la capacidad de hidrolizar oxacilina, cloxacilina y benzilpenicilina, y confieren un cierto grado de resistencia a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Algunas tienen aumentado el espectro de actividad frente a cefalosporinas (OXA-1) y carbapenémicos (OXA-50) o se encuentran asociadas a otras  $\beta$ -lactamasas como CTX-M-15 (OXA-1) o VIM-7 (OXA-45), confiriendo resistencia a todos los  $\beta$ -lactámicos (50, 262, 462, 482). La primera variante descrita en este grupo de enzimas fue OXA-1 detectada en *E. coli*, aunque su asociación a integrones y plásmidos permitió su diseminación a otras especies de *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, donde esta enzima y sus derivadas son particularmente abundantes actualmente (305).

Las  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC (clase C según el esquema de Ambler) hidrolizan cefalosporinas de tercera generación, pero también tienen actividad frente a cefamicinas e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, no afectando a cefepima o cefpiroma. Sin embargo, los microorganismos que contienen estas enzimas son generalmente susceptibles a los carbapenémicos. Los genes *bla*<sub>AmpC</sub> se encuentran localizados en el cromosoma de algunas especies pertenecientes a los géneros *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Morganella* spp. y *Serratia* spp., y se les atribuye un papel fisiológico secundario en la

maduración del peptidoglicano. Se encuentran también en *E. coli* pero su expresión es de bajo nivel y normalmente no tienen un carácter inducible, ya que carecen de *ampR* (implicado en el sistema de inducción). La presencia de mutaciones en las secuencias promotoras de genes reguladores dan lugar a una hiperexpresión estable de estas enzimas, que también puede ser inducida por exposición a  $\beta$ -lactámicos y que constituye un problema serio en Unidades de Cuidados Intensivos (49, 351, 352). En los últimos años, se han descrito genes codificantes de AmpC de localización plasmídica, generalmente no inducibles, designadas CMY, FOX, LAT, CIT u otras. Los genes correspondientes están frecuentemente asociados a integrones de clase 1 que contienen *ISCR1*, siendo las de tipo CMY las que más se han diversificado (361,460).

Las *carbapenemasas* incluyen enzimas de clase A (KPC), B (MBL) y D (tipo OXA). Las enzimas de clase A son las *carbapenemasas* en *K. pneumoniae* (KPC), que confieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación, a carbapenémicos y aztreonam, siendo inhibidas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (356, 384, 505). Tres variantes han sido descritas (KPC-1, KPC-2 y KPC-3). Estas enzimas fueron inicialmente identificadas en Estados Unidos y en aislados de *K. pneumoniae* de origen nosocomial (81), aunque en los últimos años haya sido también descrito en otras regiones geográficas (China, Grecia, Colombia, Israel), en otras especies (*E. coli*, *K. oxytoca*, *Enterobacter* sp., *C. freundii*, *S. marcescens* y *P. aeruginosa*) (70, 100, 198, 388, 478) y en la comunidad (469). La localización de algunos de estos genes en transposones derivados de Tn3 (*Tn4401*) podría ser responsable de su diseminación (307). Las carbapenemasas de clase B, las *metalo- $\beta$ -lactamasas* (MBL) constituyen un grupo heterogéneo de enzimas que hidrolizan imipenem o meropenem, cefalosporinas de tercera generación pero no aztreonam o inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Las primeras  $\beta$ -lactamasas de este grupo identificadas fueron las de tipo IMP en aislados de *P. aeruginosa* y distintas especies de enterobacterias (201, 485), y posteriormente las enzimas de tipo VIM (97). Aunque se han descrito otras familias (SPM, GIM, SIM), su prevalencia es mucho menor (481). Hoy en día, las metalo- $\beta$ -lactamasas del grupo B (tipos IMP y VIM) constituyen las más frecuentes en clínica y están muy distribuidas principalmente en Sudamérica y Europa. Se asocian frecuentemente a integrones y/o plásmidos en especies como *Pseudomonas* spp., *S. maltophilia*, *Aeromonas* spp., *Bacillus cereus*, *Flavobacterium* spp., *Chryseobacterium* spp., y *Legionella gormanii*, aunque la emergencia y diseminación de estas enzimas entre miembros de *Enterobacteriaceae* está aumentando considerablemente (222, 319, 481). Las carbapenemasas de clase D se dividen en 8 grupos y hidrolizan imipenem pero no cefalosporinas de tercera generación. Tienen poca homología con otras enzimas de tipo OXA y en contraste con estas, no se asocian a integrones si no que se encuentran frecuentemente en el cromosoma bacteriano, o en plásmidos (OXA-48). Estas enzimas están muy distribuidas en *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (12, 482).

### 1.4.2. Resistencia a antibióticos no $\beta$ -lactámicos asociados a cepas con BLEE

Los genes *bla* se encuentran frecuentemente en elementos modulares que contienen otros determinantes de resistencia a antibióticos en integrones y/o transposones. La expresión de estas estructuras determina un fenotipo de multiresistencia que compromete seriamente el éxito terapéutico y contribuye a la diseminación y persistencia de microorganismos portadores de BLEE en ambientes selectivos por procesos de co-selección (353, 480).

Los genes frecuentemente asociados a *bla* confieren resistencia a diferentes familias de antibióticos: *aac* o *aad* (aminoglucósidos), *dfr* (trimetoprim), *cml* o *cat* (cloranfenicol), *qac* (compuestos de amonio cuaternario), *bla<sub>OXA</sub>* ( $\beta$ -lactámicos), *tet* (tetraciclinas) y *sul* (sulfamidas). Algunos de estos determinantes se encuentran asociados a integrones que poseen genes *bla<sub>BLEE</sub>* específicos como *bla<sub>CTX-M-2</sub>*, *bla<sub>CTX-M-9</sub>*, *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, *bla<sub>GES</sub>*, *bla<sub>VEB</sub>*, y *bla<sub>IBC</sub>* o genes que codifican carbapenemasas (*bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*). En los últimos años se han detectado genes que confieren resistencia a fluoroquinolonas y/o aminoglucosidos, y que incluyen *qnr*, *aac*, *arm* y *rmt* (126, 271, 399). El gen *qnr*, que confiere resistencia mediada por plásmidos a quinolonas fue descrito en 1998 en *K. pneumoniae* (281) y en los últimos años se han identificado distintas variantes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) en diferentes especies (*Salmonella* spp., *Klebsiella* spp. y *E. coli*) asociadas a *bla<sub>BLEE</sub>* muy diversas: *qnrB* a *bla<sub>CTX-M-15</sub>* y *bla<sub>SHV-12</sub>*, *qnrA* a *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *bla<sub>VEB-1</sub>*, *bla<sub>SHV-12</sub>* u otras, y *qnrS* a *bla<sub>SHV-12</sub>*, *bla<sub>TEM-52</sub>* y *bla<sub>CTX-M-1</sub>* (203, 369). La enzima *aac(6')-Ib-cr* (6'-N-acetiltransferasa tipo Ib, variante cr) inactiva simultáneamente aminoglucósidos y algunas fluoroquinolonas (399, 406) y ha sido identificada en una región de multi-resistencia de un plásmido derivado de R100 que contiene también *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, *bla<sub>TEM-1</sub>* y *bla<sub>OXA-1</sub>* (50, 94). Los genes asociados a la producción de 16S rARN metilasas se identificaron por primera vez en 2003 en *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, y confieren un alto nivel de resistencia a la mayor parte de los aminoglucosidos utilizados en la práctica clínica (155, 507). Se han descrito distintas variantes (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rtmC* y *rmtD*) en *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*, asociadas a *bla<sub>BLEE</sub>* (*bla<sub>TEM-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M-14</sub>*, *bla<sub>SPM-1</sub>* y *bla<sub>CTX-M-3</sub>*), secuencias de inserción y transposones y/o plásmidos específicos (126).

### 1.4.3. Evolución de las $\beta$ -lactamasas

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos constituyen probablemente la familia de antibacterianos sobre los que tanto la ingeniería biológica natural como la industria farmacéutica han introducido un mayor número de modificaciones químicas para alterar su espectro. Por ello las  $\beta$ -lactamasas han sido el grupo de genes de resistencia que más se ha diversificado, evolucionando hacia un espectro de actividad enzimática más amplio (166).

Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado en las  $\beta$ -lactamasas de tipo TEM (cerca de 160 variantes descritas, <http://www.lahey.org/Studies/>). Las mutaciones puntuales en genes *bla*<sub>TEM</sub> dan lugar a una mayor actividad de sustrato a la combinación de un  $\beta$ -lactámico más un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas (S130G en TEM-76) o a cefalosporinas de tercera generación (G238S en TEM-19) (249, 440). El análisis comparativo de secuencias que codifican para enzimas de tipo TEM, SHV y OXA ha permitido en distintos estudios inferir la evolución de enzimas de estos grupos por adquisición de distintas mutaciones a lo largo del tiempo y establecer posibles rutas evolutivas (18, 112, 200).

Desde la descripción de FEC-1, el primer miembro del grupo CTX-M identificado en 1986, confirmando valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) a cefotaxima y ceftazidima de 200  $\mu\text{g/ml}$  y 12.5  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente (283), más de 70 enzimas han sido descritas. Estas se subdividen en 5 grupos (ver apartado 1.4.1.1, <http://www.lahey.org/Studies/>): CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25. Sin embargo, a pesar de que se han propuesto como ancestros de algunos genes *bla*<sub>CTX-M</sub> genes cromosómicos de bacterias medioambientales del género *Kluyvera* (118, 330, 403), los estudios de reconstrucción filogenética en miembros de esta familia son escasos (22a, 45). La exposición de las bacterias productoras de enzimas de tipo CTX-M a una gran diversidad de antibióticos  $\beta$ -lactámicos para los cuales no eran muy eficientes como cefotaxima-ceftriaxona, cefepima y ceftazidima, podría haber contribuido a la diversificación observada, y su localización en plataformas móviles y altamente diseminadas a su dispersión (166).

La mayor parte de esas enzimas hidrolizan eficientemente cefotaxima, con valores de CMI  $>64 \mu\text{g/ml}$ , mientras que los valores de CMI frente a ceftazidima (2-8  $\mu\text{g/ml}$ ) indican una mayor susceptibilidad a este antibiótico. Sin embargo, la diversificación en este grupo de enzimas ha originado variantes con capacidad de hidrólisis pronunciada frente a ceftazidima que se puede traducir en valores de CMI de hasta 256  $\mu\text{g/ml}$  (353). Si bien hasta la fecha no se ha descrito el aislamiento clínico de ninguna bacteria portando una  $\beta$ -lactamasa de tipo CTX-M con incrementada actividad sobre la combinación de un  $\beta$ -lactámico más un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas, estas variantes han podido ser construidas *in vitro* (13).

El aumento del espectro de actividad frente a ceftazidima por parte de las enzimas de tipo CTX-M se asocia a la presencia de mutaciones en las posiciones 167 (P167S/T/Q) y 240



(D240G), de acuerdo con el esquema de numeración de  $\beta$ -lactamasas de Ambler *et al.* (5). Las enzimas que codifican presuntivamente para un fenotipo de resistencia a ceftazidima se distribuyen en distintas ramas filogenéticas: familias CTX-M-1 (CTX-M-15, CTX-M-23, CTX-M-28, CTX-M-29, CTX-M-32, CTX-M-33, CTX-M-42, CTX-M-52, CTX-M-53, CTX-M-54, CTX-M-57 y CTX-M-58), CTX-M-2 (CTX-M-35 y CTX-M-43), CTX-M-9 (CTX-M-16, CTX-M-19, CTX-M-27) y CTX-M-25 (CTX-M-25 y CTX-M-41) (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>).

Las enzimas de la familia CTX-M-1 son las que han sido sometidas a un proceso más eficaz de diversificación (26 variantes), y es en esta familia donde más variantes resistentes a ceftazidima se han identificado (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>). Algunas de ellas han adquirido un interés adicional debido a su diseminación en distintos compartimentos y/o en amplias áreas geográficas, como CTX-M-15 (a nivel mundial) y CTX-M-32 (animales y humanos) (50, 56, 74, 80, 94, 368).

La continua aparición de nuevas variantes con incrementada actividad enzimática respecto a su ancestro más inmediato no solo limita las estrategias de tratamiento antibiótico, sino que además puede facilitar la aparición de brotes epidémicos por el previsible incremento del número absoluto de células resistentes.

#### 1.4.3.1. Estrategias desarrolladas para la predicción de la aparición de nuevas variantes con mayor espectro de actividad

La evolución de las BLEEs hacia un mayor espectro de actividad ha motivado diferentes estudios, tanto para identificar las estrategias para reproducir la aparición de mutantes resistentes *in vitro*, como para predecir, a partir del estudio de esos mutantes, nuevos pasos evolutivos (22, 180, 332, 499). De manera genérica, para conseguir el primer objetivo, se pueden utilizar estrategias de mutagénesis al azar o estrategias de mutagénesis dirigida.

#### **Mutagénesis al azar**

Las estrategias de mutagénesis al azar (*random mutagenesis*) se emplean cuando se pretende obtener el mayor número de variantes posible que confieran un determinado fenotipo, sin que se pueda dirigir de alguna manera la eficacia de tales variantes. Estas técnicas se han considerado fiables para la reproducción de la evolución natural de enzimas de tipo TEM o CTX-M (21, 42, 119, 133, 221, 491). En la mutagénesis al azar empleamos procedimientos menos eficientes aunque más naturales (uso de cepas hipermutadoras), y también procedimientos extraordinariamente poderosos, aunque poco naturales (barajado de ADN, conocido como “ADN *shuffling*”, o uso de fágemidos o análogos de ADN). En el primer caso, las mutaciones suelen aparecer secuencialmente (133, 150, 221), mientras que en el último caso

las mutaciones pueden aparecer simultáneamente, siendo más difícil determinar su contribución a la aparición de un fenotipo determinado (119, 491).

Los estudios previos de LeClerc y Oliver han servido de base a la utilización de cepas de *E. coli* hipermutadoras para predecir la aparición de cepas resistentes (246,247, 327). El empleo de cepas deficientes en *mutS* reproduce una situación natural en las poblaciones bacterianas, ya que la mayoría de las cepas hipermutadoras naturales descritas hasta la fecha son defectivas en el gen *mutS*, permitiendo así una mayor aproximación a las condiciones fisiológicas que dan lugar a la emergencia de mutantes naturales (246, 247). En un trabajo anterior realizado por nuestro grupo, se validó el uso de cepas hipermutadoras con el objetivo de provocar la aparición de mutantes en genes *bla<sub>BLEE</sub>* en *H. influenzae*, que diesen lugar a la aparición de  $\beta$ -lactamasas mutantes con mayor espectro de actividad frente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos (de tercera generación y/o combinaciones con inhibidores de  $\beta$ -lactámicos (150).

### ***Mutagénesis dirigida***

Las estrategias de mutagénesis dirigida se emplean cuando se pretende identificar el efecto de una mutación específica en el fenotipo. Consisten en la incorporación del cambio nucleotídico pretendido a un gen determinado utilizando oligonucleótidos que contienen dicho cambio. Esta es una técnica directa con la que se pueden introducir un número elevado de mutaciones de forma secuencial, revelándose muy útil en el análisis de los efectos de cambios específicos, como reflejan los estudios realizados en enzimas de tipo TEM y SHV (36, 440).



# Capítulo 2

---

## HIPÓTESIS DE TRABAJO y OBJETIVOS

“La imaginación es más importante que la sabiduría.”

**Albert Einstein**

“La duda es el principio de la sabiduría.”

**Aristóteles**



La actividad de unidades biológicas de captura y dispersión de los genes de resistencia a diferentes agentes biocidas determina la prevalencia y distribución geográfica de la resistencia. Las unidades biológicas actúan a diferentes niveles jerárquicos, incluyendo aquellas implicadas en captura y transmisión horizontal (plásmidos, transposones e integrones), y en la diseminación en ambientes microecológicos específicos (clones y poblaciones bacterianas). La contribución específica y la interacción entre clones epidémicos y elementos de transmisión horizontal ha sido poco explorada y resulta esencial para establecer estrategias eficaces de control y tratamiento de infecciones hospitalarias, desarrollar nuevas aproximaciones en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antibiótica y lograr un mejor conocimiento de la evolución bacteriana.

Esta tesis propone el análisis de los elementos implicados en la captura, expresión y diseminación de los genes *bla*<sub>BLEE</sub> que codifican la producción de enzimas que confieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación como un modelo idóneo para analizar las razones que pudieran explicar la evolución acelerada de la resistencia a antimicrobianos causada por la adquisición y reciente diseminación pandémica de estos genes en el ámbito intra y extrahospitalario.

Nuestra **hipótesis de trabajo** consiste en que *la presión selectiva múltiple de diferentes agentes biocidas ha favorecido la selección de unidades genéticas específicas con elevada tasa de transmisibilidad. La prevalencia de determinados sistemas de captura de secuencias y su transmisibilidad en distintas áreas geográficas podría haber determinado la diseminación local de nuevos genes de resistencia a partir del éxito adaptativo de clones, plásmidos, y plataformas genéticas específicas ampliamente diseminados en el medio ambiente.*

El **objetivo general** de este trabajo es evaluar la contribución relativa de la transmisión vertical y horizontal en la diseminación de *Enterobacteriaceae* productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) durante un periodo de 16 años (1988-2004).

Los **objetivos específicos** de esta tesis son:

- Evaluar la contribución de la diseminación clonal y la de elementos de transmisión horizontal en el aumento reciente de la resistencia a antibióticos en enterobacterias, analizando las diferencias espaciales y temporales en la prevalencia de las especies, los clones y los elementos de transmisión horizontal implicados.
- Analizar la estructura poblacional de *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE en un hospital universitario terciario desde la detección del primer aislado.
- Caracterizar la diversidad de plásmidos (y los transposones e integrones localizados en los mismos) asociados a los genes *bla*<sub>BLEE</sub>.
- Predecir la capacidad de diversificación de las enzimas de la familia CTX-M y la asociación con su espectro de actividad, analizando la contribución de mutaciones específicas a la resistencia frente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

# Capítulo 3

---

## RESULTADOS

“La inspiración existe, pero tiene que encontrarte trabajando.”

**Pablo Ruiz Picasso**





En esta sección y a principio de cada apartado, se hará un breve resumen relativo a la información considerada relevante para un mejor seguimiento de los resultados.

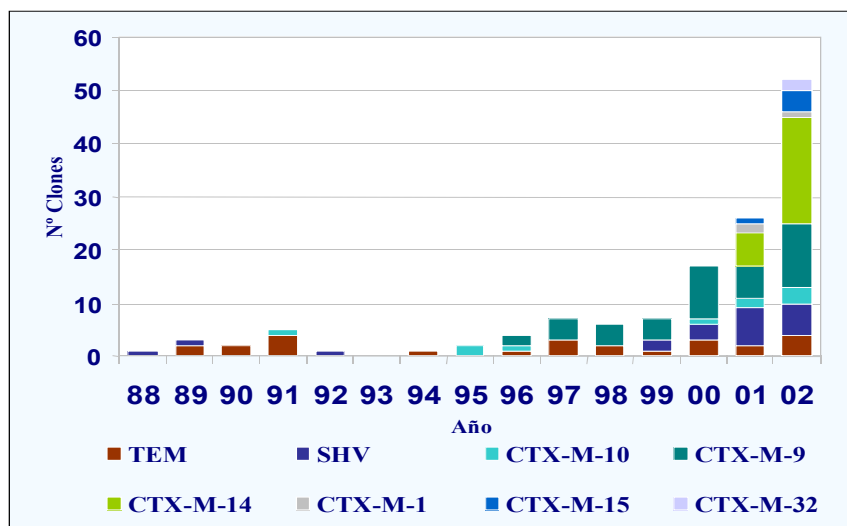
### 3.1. Epidemiología de *Enterobacteriaceae* productores de BLEE (1988-2004)

Los aislados de *Enterobacteriaceae* productores de BLEE correspondientes al periodo estudiado se caracterizaron por una *gran diversidad* de especies, clones y elementos de resistencia asociados a los genes que codifican cada una de las variantes identificadas. La *distribución temporal y espacial* de las BLEE, su evolución desde la detección del primer aislado y su asociación con hospedadores específicos se analizan a continuación.

**Distribución temporal de BLEE.** Todas las BLEE correspondientes a los aislados analizados (1988-2004) fueron identificadas como BLEE de clase A de los grupos TEM, SHV y CTX-M. Las  $\beta$ -lactamasas de clase B y de clase C fueron detectadas en nuestra institución a partir de 2005 (452, resultados no publicados). El primer enzima detectado fue de tipo SHV (SHV-2) en el año 1988, seguido de variantes de tipo TEM (TEM-4) en el año 1989 y de enzimas de tipo CTX-M en 1991 (CTX-M-10). A partir del año 1996, el aislamiento de enzimas del grupo CTX-M aumentó extraordinariamente, con la **aparición secuencial** de variantes de distintos grupos: CTX-M-9 en 1996, CTX-M-14 en 2000 (ambas del grupo CTX-M-9) y diversas variantes del grupo CTX-M-1 a partir de 2000 de forma simultánea (CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-15 y CTX-M-32) (figura 8).

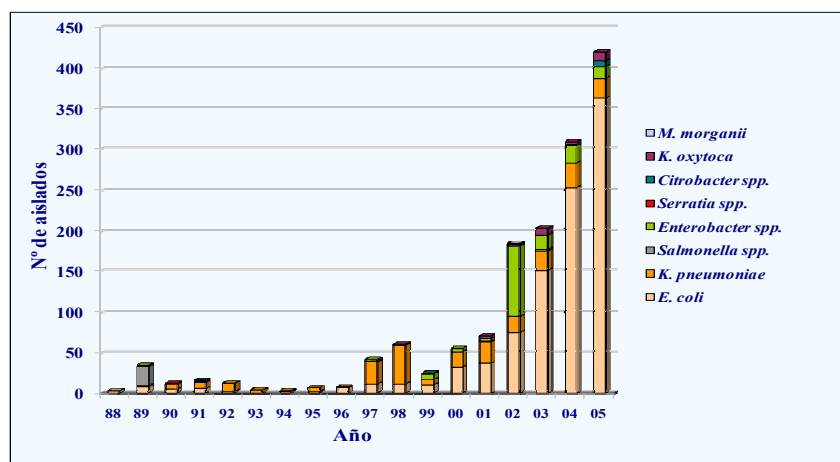
Aunque se identificaron diversas variantes de cada familia, la diversidad encontrada fue menor que la descrita en otras series (18): TEM (-4, -12, -24, -52), SHV (-2, -5, -12, -13) y CTX-M (-1, -3, -9, -10, -14, -15, -32). Algunas variantes fueron particularmente prevalentes como TEM-4 o SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-14 o CTX-M-10 debido a su asociación con clones o elementos epidémicos o endémicos (321, figura 8).

**Distribución compartimental de BLEE.** En la última década, la prevalencia de microorganismos productores de BLEE aumentó considerablemente en aislados procedentes tanto del ámbito hospitalario como comunitario (figura 9A). Hasta el año 2001, las infecciones causadas por microorganismos productores de BLEE fueron preferentemente de adquisición nosocomial, mientras que a partir de 2002, la mayoría de las mismas fueron adquiridas en la comunidad (figura 9B).

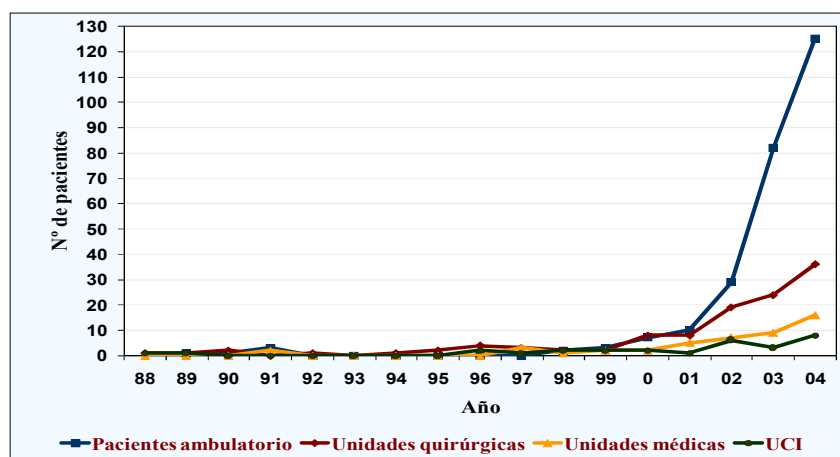


**Figura 8.** Distribución de los aislamientos de *E. coli* productores de BLEE del Hospital Universitario Ramón y Cajal por grupo de BLEE (1988-2002).

A



B



**Figura 9.** Distribución temporal (A) y compartimental (B) de los aislamientos de *Enterobacteriaceae* productores de BLEE del Hospital Universitario Ramón y Cajal (1988-2005).

### 3.1.1. Caracterización de la estructura poblacional de *Enterobacteriaceae*

**Especies implicadas.** Las especies productoras de BLEE más frecuentemente aisladas son *E. coli* (n=181 aislados) y *Klebsiella pneumoniae* (n=85 aislados), seguidas de *Enterobacter* spp. (n=7). Otras enterobacterias como *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp. o *Serratia* spp. fueron detectadas ocasionalmente (11, 4 y 1 aislados respectivamente).

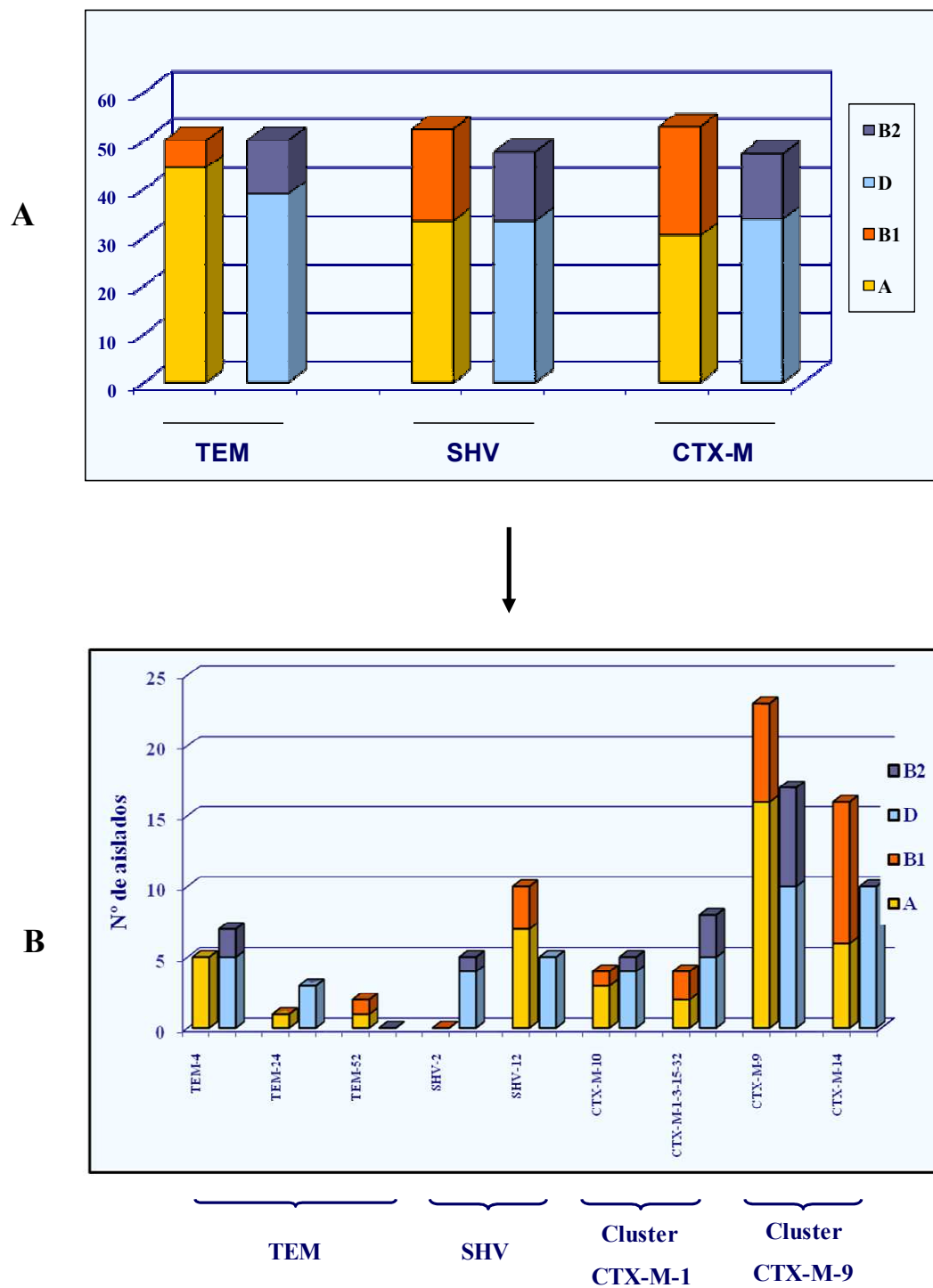
La frecuencia relativa de las dos especies mayoritarias varió en cada período analizado siendo el hospedador preferencial *K. pneumoniae* en los años 90 (ratio *K. pneumoniae*/*E. coli*=1.38) y *E. coli* a partir de 2000 (ratio *K. pneumoniae*/*E. coli*=0.24). Esta variación refleja el cambio en la frecuencia de los cuadros clínicos más frecuentemente diagnosticados (bacteriemias vs infecciones urinarias y no graves), el origen de los mismos (adquisición hospitalaria vs comunitaria) y el tipo de BLEE (aumento exponencial de enzimas de tipo CTX-M a partir de 1996) (ver figuras 8 y 9).

Se observó una asociación de algunos tipos de BLEE y determinadas especies. Las distintas variantes de enzimas de tipo CTX-M están asociadas mayoritariamente a *E. coli* y algunas variantes de enzimas de tipo TEM y SHV a *K. pneumoniae* (TEM-4 o SHV-2). En ausencia de amplificación clonal, esto sugiere la implicación de elementos de transferencia horizontal cuya diseminación y/o persistencia ocurre de forma preferencial en estas especies (ver apartados 3.1.2, 3.1.3 y 3.1.4).

**Diversidad clonal.** La población de *Enterobacteriaceae* productores de BLEE estudiada se caracterizó por una gran **diversidad clonal** dentro de cada especie, reflejada en el número de pulsotipos identificados: *E. coli* (n=132), *K. pneumoniae* (n=40), *Enterobacter aerogenes* (n=1), *Salmonella* spp. (n=7), *Enterobacter cloacae* (n=13), *K. oxytoca* (n=7) y *Citrobacter freundii* (n=4). Sin embargo, también se detectaron clones epidémicos de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes* y *Salmonella* spp. Estos incluyen *E. coli* ST131 productor de CTX-M-15 (pandemia mundial 2001-2005), *E. coli* productor de CTX-M-1 (2001-2002), *E. coli* y *K. pneumoniae* productor de TEM-4 (1989-1997 y 2002-2003, respectivamente), *E. aerogenes* productor de TEM-24 (1998-2004) y *S. enterica* productor de TEM-27 (1989). Las variantes no productoras de BLEE de algunos de estos clones como *E. coli* ST131, *E. coli* ST405 o el clon de *E. aerogenes* han sido también identificados en diferentes estudios, lo que indica el éxito de algunos clones que han servido como sustrato para la diseminación de plásmidos de resistencia (130, 451, <http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst/dbs/Ecoli/>).

*La distribución geográfica de los aislados productores de cada tipo de BLEE es desigual y ha motivado **situaciones epidémicas a nivel local, continental y global**. Los microorganismos productores de SHV-12, CTX-M-32 y TEM-24 se encuentran actualmente diseminados en distintos países de la Unión Europea. La enzima CTX-M-15 ha sido descrita en países de los 5 continentes y constituye la  $\beta$ -lactamasa más frecuentemente identificada en la actualidad, relacionada con clones y/o plásmidos ampliamente diseminados (ver apartado 3.2.3). Las BLEE CTX-M-9 y TEM-4 permanecen confinadas a España, asociadas principalmente a *E. coli* y *K. pneumoniae* respectivamente, aunque se han descrito casos esporádicos en otros países de Europa. Aunque todas estas BLEE se han asociado a diferentes especies, su amplia diseminación ha estado motivada por la dispersión de clones específicos de *E. aerogenes* (TEM-24), *E. coli* (CTX-M-14, CTX-M-15 y SHV-12) o *K. pneumoniae* (TEM-4, SHV-12) y/o plásmidos (TEM-24, SHV-12, CTX-M-14, CTX-M-15 y CTX-M-32). En este estudio se profundizará en el análisis de aislados productores de distintas BLEE representativas de situaciones epidémicas locales e internacionales.*

La caracterización de la **estructura poblacional de *E. coli*** se ha realizado en base a la identificación de sus grupos filogenéticos e indica que la composición de los aislados productores de las familias TEM, SHV y CTX-M es similar (análoga *carrying capacity*). La frecuencia de aislados de *E. coli* de los filogrupos A y B1 (52%, 36% y 16% respectivamente) frente a los filogrupos D y B2 (48%, 35% y 13%, respectivamente) parece estar relacionada con el aumento de aislados de adquisición comunitaria productores de enzimas de los tres grupos (TEM, SHV y distintas variantes del tipo CTX-M) en los últimos años del período estudiado (figura 10).



**Figura 10. Distribución de aislados de *E. coli* productores de BLEE por grupo filogenético (Hospital Universitario Ramón y Cajal, 1988-2002).** A. Distribución de grupos filogenéticos por familia de BLEE (TEM, SHV, CTX-M). B. Distribución de grupos filogenéticos por tipo de BLEE.

### 3.1.2. Caracterización de plásmidos con genes BLEE

La transferencia de resistencia a cefalosporinas de tercera generación por conjugación “*in vitro*” varió entre el 79% y el 85% de los aislados analizados productores de TEM (79%), SHV (81%) y CTX-M (85%).

El análisis del contenido plasmídico de las cepas productoras de BLEE reveló la presencia de un número variable de plásmidos (entre 1 y 5) de distintos tamaños (2-320 kb). Los plásmidos portadores de genes *bla*<sub>BLEE</sub> presentaron un tamaño variable (35-320kb) y fueron mayoritariamente clasificados como plásmidos conjugativos pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncP1- $\alpha$ , IncN, IncA/C<sub>2</sub>, IncHI2, IncL/M, IncFII e IncI1 (99). La diseminación de algunas BLEE fue asociada a **plásmidos epidémicos** de grupos de incompatibilidad específicos identificados en un elevado número de cepas durante distintos periodos de tiempo (tabla 5).

Los plásmidos epidémicos portadores de genes *bla*<sub>BLEE</sub> identificados fueron:

• IncFII (85-160kb, CTX-M-15)	Identificado en todo el mundo
• IncI1 (35-120kb, TEM-4)	Identificado en Europa, Taiwan
• IncL/M (50kb, CTX-M-1)	Identificado en España y países de Europa del Este
• IncHI2 (240-320kb, CTX-M-9)	Identificado en Europa, Inglaterra, Taiwan y Estados Unidos
• IncP1- $\alpha$ (100kb, CTX-M-9)	Identificado en España, Inglaterra y Alemania
• IncA/C <sub>2</sub> (180kb, TEM-24)	Identificado en España, Portugal, Francia y Bélgica
• IncN (40kb, CTX-M-32)	Identificado en países del área mediterránea

El análisis de los tipos de plásmidos en las cepas productoras de BLEE reveló la presencia habitual de plásmidos de la familia repFIIA, que incluye los grupos IncFI, IncFII, IncI1, IncB/O, IncL/M e IncK (334). Los plásmidos pertenecientes a esta familia presentan variaciones en las regiones *rep* y *cop* motivadas por fenómenos de recombinación genética, lo cual puede dar lugar a alteraciones en la incompatibilidad de los mismos (94, 334, ver apartados 1.3.1.1 y 3.2.3.3). Los fenómenos de recombinación entre plásmidos parecen ser bastante comunes como refleja la frecuente variación del tamaño plasmídico, la transferibilidad, el contenido de replicones o la presencia de elementos genéticos móviles observada en plásmidos IncFII o IncHI2 responsables de la diseminación de genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (ver los apartados 3.2.3.3 y 3.2.1.2). La detección de plásmidos con replicones asociados a plásmidos de

distintos grupos de incompatibilidad indica la formación de cointegados. Este fenómeno fue observado en distintas ocasiones (plásmidos de tipo IncF e IncHI2) y parece ser frecuente bajo determinadas condiciones de selección.

### 3.1.3. Caracterización de transposones con genes BLEE

La presencia y diversidad de distintas secuencias de inserción (IS) y transposones relacionados con la expresión y diseminación de genes *bla* fue investigada. Las secuencias de inserción identificadas (*ISEcPI* e *ISCR1* asociadas a genes *bla*<sub>CTX-M</sub> e *IS26* asociada a genes *bla*<sub>SHV</sub>) favorecen la **expresión** de los genes *bla* a través de la presencia de promotores específicos y fueron asociadas a grupos determinados. Las estructuras genéticas que contienen estos elementos se encuentran habitualmente localizadas en transposones (generalmente derivados de *Tn21*) y/o plásmidos (ver apartado anterior) que favorecen su **diseminación**. Algunas ISs parecen contribuir también a la diseminación al facilitar distintos fenómenos de recombinación genética (*IS5075* e *IS26*) (tabla 5).

- ***ISEcPI*** fue identificada en una posición anterior a genes *bla*<sub>CTX-M</sub> del grupo CTX-M-1 (*bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>CTX-M-32</sub>), con excepción de *bla*<sub>CTX-M-10</sub>, cuyo gen se encuentra localizado en una estructura genética probablemente derivada de fagos (329). La distancia nucleotídica intergénica entre las ISs y el gen *bla* fue variable para cada variante analizada: *bla*<sub>CTX-M-3</sub> (46bp), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (49 pb), *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (80 pb) y *bla*<sub>CTX-M-32</sub> de (80 pb), sugiriendo fenómenos de adquisición independiente de estos genes. El promotor que dirige la expresión de estos genes (TTGAAA-17pb-TACAAT) se sitúa a una distancia de 149-185 pb del codon de iniciación del gen *bla*<sub>CTX-M</sub> considerado.
- ***ISCR1*** fue asociada a los genes *bla*<sub>CTX-M-2</sub> y *bla*<sub>CTX-M-9</sub> localizados en integrones de clase I designados como In35 (número de acceso GenBank AY079169) e In60 (número de acceso GenBank AF174129). Estos integrones son derivados de *Tn402* localizados en *Tn21* (322, 471). El promotor que dirige la expresión de estos genes (TAAACG-17pb-TAAGAT) fue localizado a una distancia de 94-266 pb del codon de iniciación del gen *bla*<sub>CTX-M</sub> considerado.
- ***IS26*** fue detectada en plásmidos de los grupos IncFII e IncHI2 portadores de los genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>CTX-M-9</sub> respectivamente, donde se encontró en múltiples copias favoreciendo fenómenos de recombinación genética.



**Tabla 5.** Entorno genético, tipos de plásmidos, especies y grupos filogenéticos asociados a *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE en el Hospital Universitario Ramón y Cajal (1988-2004)

Familia BLEE	Variante BLEE	Entorno Genético <sup>a</sup>	Localización gen <i>bla</i> <sup>b</sup>	Especie	Grupos Filogenéticos frecuentes	Tamaño plásmido portador <i>bla</i> (kb) <sup>c</sup>	Grupo Inc plásmido portador <i>bla</i> <sup>d</sup>	Frecuencia de aislamiento	Período aislamiento	Distribución
TEM	TEM-4	Tn3	P	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>C. freundii</i>	D, B2 A	35-120	IncFII, IncI1	Epidémico	1989-2004	España, Francia, Polonia, Túnez
	TEM-24	TnI In0-Tn2I, In4-TnI/696	P	<i>E. aerogenes</i>	D A	180	IncA/C <sub>2</sub>	Epidémico	1999-2004 <sup>e</sup>	Europa
				<i>E. coli</i>						
				<i>K. pneumoniae</i>						
				<i>K. oxytoca</i> <i>P. vulgaris</i>						
SHV	SHV-2a	IS26	-	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	A, B1	>150	IncF-like	Epidémico	1988-2000	Europa, Canadá, Corea, Taiwán
	SHV-12	IS26	P	<i>E. coli</i>	-	50-150	IncN	Epidémico No epidémico	1999-2002	Europa, Asia, Estados Unidos, Canadá
				<i>K. pneumoniae</i>						
CTX-M-9	CTX-M-9	ISCR1-Tn2I	P+C	<i>E. coli</i>	A, B1	240-320	IncHI2	Epidémico	1996-2003	Europa, Brasil, Taiwan
				<i>K. pneumoniae</i>	A, B1	100	IncPI-α	Epidémico		
				<i>E. cloacae</i> <i>S. enterica</i>	-	140-160	IncFIB	No epidémico		
	CTX-M-14	ISEcPI- <i>bla</i> -IS903Δ ISCR1- <i>bla</i>	P	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	A, B1	48-340	Complejo IncI	Epidémico No epidémico	2000-2002	Europa, Estados Unidos, Canadá, Asia
CTX-M-1	CTX-M-1	ISEcPI- <i>bla</i>	P	<i>E. coli</i>	D, B2	50 40	IncL/M IncN	No epidémico	2001-2002	Europa, Túnez, Colombia
	CTX-M-3	ISEcPI- <i>bla</i>	P	<i>E. coli</i>	B1	120	IncA/C <sub>2</sub>	Esporádico	2002	Europa del Este, Asia
				<i>K. pneumoniae</i>						
	CTX-M-10	Elemento relacionado con fagos	-	<i>E. coli</i> <i>Enterobacter</i> spp.	-	40-150	NI	-	1991-2002	España, Francia

**Tabla 5.** Cont.

Familia BLEE	Variante BLEE	Entorno Genético <sup>a</sup>	Localización gen <i>bla</i> <sup>b</sup>	Especie	Grupos Filogenéticos frecuentes	Tamaño plásmido portador <i>bla</i> (kb) <sup>c</sup>	Grupo Inc plásmido portador <i>bla</i> <sup>d</sup>	Frecuencia de aislamiento	Período aislamiento	Distribución
CTX-M-1	CTX-M-15	IS26-ISEcPI- <i>bla</i> -IS26	P+C	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	D, B2	85-200	IncIII (multireplicon)	Epidémico	2001-2006 <sup>e</sup>	Todo el mundo
	CTX-M-32	ISEcPI-IS5- <i>bla</i>	P	<i>E. coli</i>	A, B1 D, B2	40	IncN	Epidémico	2000-2002	España, Italia, Grecia

<sup>a</sup> La distancia entre ISEcPI y el gen *bla* fue variable para las diferentes BLEE analizadas, lo cual indica fenómenos de inserción independientes. <sup>b</sup> P=plásmido; C=cromosoma. <sup>c</sup>

<sup>d</sup> Tamaño molecular de los plásmidos que contienen los correspondientes genes *bla* y su identificación según el grupo de incompatibilidad. <sup>e</sup> Los plásmidos analizados correspondieron a aislados de distintos países.

- **IS5075** fue identificada en los extremos terminales de transposones mercuriales del subgrupo del Tn21 (flanqueando el módulo *tnp* y el operon *mer*) localizados en plásmidos de tipo IncA/C<sub>2</sub> (este estudio), o en plásmidos de tipo IncFII (pRMH760) o IncHI1 (pHCM1) (342, 344). Esta IS fue idéntica a la encontrada en una variante del transposón Tn1721 identificada en *A. baumannii* (número de acceso Genbank AY196695).
- **Transposones mercuriales derivados de Tn21** fueron asociados a integrones de clase 1 localizados en plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncHI2 (*bla*<sub>CTX-M-9</sub>), IncP1- $\alpha$  (*bla*<sub>CTX-M-9</sub>), e IncA/C<sub>2</sub> (*bla*<sub>TEM-24</sub>), y anteriormente en plásmidos de tipo IncFII multi-resistentes y ampliamente diseminados, como es el caso de los plásmidos NR1 (R100) o pC15-1a (portador de *bla*<sub>CTX-M-15</sub>) (50, 256). Las estructuras identificadas fueron idénticas a Tn21 y a Tn1696 descritos anteriormente y estaban asociadas a distintas variantes de integrones de clase 1 derivados de Tn402 pertenecientes a diferentes líneas evolutivas (In0 e In2 o In4). La presencia de estos elementos en distintos tipos de plásmidos y asociados a diferentes genes *bla* indica su importancia en la actual diseminación de la resistencia a antibióticos y parece contribuir a la evolución intra o inter-plasmídica a través de fenómenos de recombinación entre regiones homólogas.

### 3.1.4. Caracterización de integrones

La mayoría de aislados (n=117/201, 58.2%) contenían integrones de clase 1 (50.7%) y de clase 2 (7.5%). Los integrones de clase 1 se asociaron a plásmidos en distintas especies, mientras los integrones de clase 2 se localizaron en el cromosoma de aislados de *E. coli*.

Los integrones de clase 1 fueron clasificados en dieciséis tipos (I-XVI) atendiendo a la secuencia de los *gene cassettes* de su parte variable (tabla 6). Los tipos más comunes fueron el tipo I (*aadA1*), 100% homólogo a Tn21 (número de acceso Genbank AF071413), el tipo IV (*dfrA16-aadA2*, número de acceso Genbank AY259085) en plásmidos específicos IncHI2 o IncP1- $\alpha$ , el tipo II (*dfrA1-aadA1*, 99% homólogos a otros en el Genbank) y el tipo VII (*aac(6')-Ib*, también designado *aacA4*, 99% homólogo al del plásmido pSa, número de acceso Genbank L06822), identificados en plásmidos IncA/C<sub>2</sub>. La localización de los integrones identificados en plásmidos epidémicos y/o transposones muy diseminados como Tn21 parece haber influenciado su amplia diseminación en enterobacterias. La diversidad de tipos de integrones en *K. pneumoniae* fue superior a la de *E. coli* (ratios de 0.5 y 0.17 respectivamente), confirmando la amplia dispersión de determinados elementos principalmente asociados a *E. coli*.

**Tabla 6.** Integrones de clase 1 y 2 en aislados de *Enterobacteriaceae* productoras y no-productores de BLEE de distintos orígenes del Hospital Universitario Ramón y Cajal (1988-2003)

Tipo integron (RFLP)	Tamaño (pb)	“Gene cassettes” <sup>a</sup>	Periodo de aislamiento	Aislados productores BLEE	Tipo Plásmido Epidémico (BLEE) <sup>b</sup>	Aislados no-productores BLEE <sup>c</sup>
I <sub>1</sub>	1000	<i>aadA1</i>	1988-2002	SHV-2, SHV-2a, -12,-13 CTX-M-9 TEM-4	NI <sup>d</sup> IncHI2 IncI1	C-nBLEE V- nBLEE
II <sub>1</sub>	1500	<i>dfrA1-aadA1</i>	1997-2002	CTX-M-9 TEM-24 CTX-M-14 CTX-M-10 SHV-12	IncHI2 IncA/C <sub>2</sub> Complejo IncI1 NT <sup>e</sup> IncI1, IncN	C-nBLEE V- nBLEE
III <sub>1</sub>	1800	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>	1997-2002	TEM-12 SHV-2 CTX-M-9	NI NI FIB	-
IV <sub>1</sub>	1500	<i>dfrA16-aadA2</i>	1996-2003	CTX-M-9 CTX-M-32	IncHI2, IncP1-α IncN	-
V <sub>1</sub>	950	<i>aadA2</i>	1998	CTX-M-9	IncHI2	-
VI <sub>1</sub>	1500	<i>dfrA17-aadA5</i>	1997-2002	SHV-12 CTX-M-14	IncI1, IncN IncI1	C-nBLEE V- nBLEE
VII <sub>1</sub>	800	<i>aac(6')-Ib (aacA4)</i>	1999-2002	TEM-24	IncA/C <sub>2</sub>	V- nBLEE
VIII <sub>1</sub>	700	<i>dfrA7</i>	2001-2002	SHV-5, -12	NI	-
IX <sub>1</sub>	800	<i>sat</i>	2001	CTX-M-14	IncI1	-
X <sub>1</sub>	1800	<i>IS1- dfrA1-orf</i>	2001	SHV-12	IncI1, IncN	-
XI <sub>1</sub>	1900	<i>dfrA5-ereA</i>	2002	CTX-M-14	IncI1	-
XII <sub>1</sub>	1900	<i>bla<sub>OXA-1</sub>-aadA1</i>	1997-2003	NI	NI	-
XIII <sub>1</sub>	1500	<i>dfrA15-aadA1</i>	2003	TEM	NI	-
XIV <sub>1</sub>	2200	<i>aac(3)-Ia-orfX...aadA1a</i>	1994	SHV-5	NI	-
XV <sub>1</sub>	1000	<i>aadA5</i>	1990	CTX-M-10	NT	-
XVI <sub>1</sub>	2000	<i>aacA4-cmlA1</i>	1999	TEM-24	IncA/C <sub>2</sub>	-
I <sub>2</sub>	1600	<i>sat-aadA1-orfX</i>	2001	NI	NI	V- nBLEE
II <sub>2</sub>	1900	<i>dfrA1-sat2-aadA1-orfX</i>	1991-2002	CTX-M-9 CTX-M-14 SHV-12 TEM-4	IncHI2 Complejo IncI1 IncI1, IncN NT	C-nBLEE V- nBLEE
III <sub>2</sub>	2300	<i>estX-sat2-aadA1-orfX</i>	2000	SHV-12	IncI1, IncN	-

<sup>a</sup> Secuencia del integron entre las regiones conservadas 5'CS y 3'CS; <sup>b</sup> Plásmidos epidémicos asociados al correspondiente tipo de integron y a la producción de BLEE, confirmando por lo tanto un fenotipo de resistencia a cefalosporinas de tercera generación; <sup>c</sup> Aislados no productores de BLEE de origen clínico (C-nBLEE) y de voluntarios sanos (V-nBLEE); <sup>d</sup> NI = No identificado; <sup>e</sup> NT = No tipable

### 3.2. Epidemiología molecular de conjuntos evolutivos en *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE

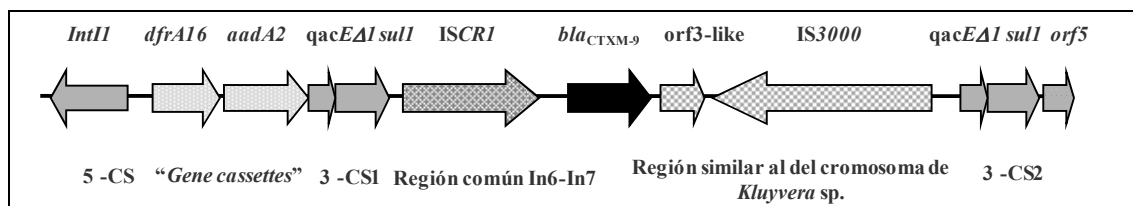
En esta sección, profundizaremos en la epidemiología de enterobacterias productoras de diferentes  $\beta$ -lactamasas que han dado lugar a situaciones epidémicas a nivel local (CTX-M-9), continental (TEM-24), y global (CTX-M-15) con el objetivo de identificar los factores que han determinado su amplia y reciente dispersión.

#### 3.2.1. Epidemiología molecular de la resistencia mediada por CTX-M-9

*La enzima CTX-M-9 y su entorno genético parcial fueron identificados inicialmente en España por Sabaté y col. en 1996 en una cepa de Salmonella de origen animal aislada en Murcia, constatándose su diseminación posterior en hospitales y en reservorios de la comunidad de otras regiones de España y Europa (191, 393, 411). Esta BLEE está ampliamente diseminada en nuestro país en la actualidad y ha sido detectada sólo de forma esporádica en determinados hospitales de Inglaterra y Francia (487, 498). El gen bla<sub>CTX-M-9</sub> había sido localizado en un integron de clase 1 denominado In60 que contiene ISCR1 (previamente denominada orf513 o CR1) y dos copias de la región 3'CS (410, figura 11).*

*En este apartado se describe la caracterización molecular del entorno completo del gen bla<sub>CTX-M-9</sub> (integrón, transposón, plásmidos y estructura poblacional de hospedador), y la evolución de los aislados productores de CTX-M-9 en este hospital desde 1996 hasta 2003 (322). Este estudio aporta una de las pocas descripciones completas de integrones que contienen ISCR1 (348, 471) y de la implicación de Tn21, siendo además uno de los primeros estudios que constata el papel de los plásmidos conjugativos clásicos en la diseminación actual de la resistencia a agentes antimicrobianos. Adicionalmente, constituye un paradigma de diseminación de resistencia causada por transferencia horizontal y uno de los pocos ejemplos de evolución plasmídica debida a diferentes procesos de recombinación entre estructuras genéticas modulares.*

*Estos resultados forman parte del manuscrito: “Dissemination and persistence of bla<sub>CTX-M-9</sub> is linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in different groups of early antibiotic resistance plasmids”. 2006. Antimicrob Agents Chemother. 50 (8): 2741-50” (ver anexo, página 169)*



**Figura 11.** Estructura del In60, integrón de clase 1 que contiene *bla<sub>CTX-M-9</sub>* (número de acceso Genbank AF174129).

### 3.2.1.1. Estructura poblacional de los aislados productores de CTX-M-9

Los setenta aislados productores de CTX-M-9 detectados en nuestro hospital entre 1996 y 2003 (66 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae*, 1 *E. cloacae* y 1 *S. enterica*) fueron clasificados en 45 pulsotipos diferentes (41 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae*, 1 *E. cloacae* y 1 *S. enterica*), reflejando una gran diversidad clonal. Los aislados identificados como *E. coli* pertenecían tanto a los grupos filogenéticos A y B1, asociados al medio extrahospitalario, como a los grupos D y B2 relacionados con el ambiente hospitalario (56% vs 44%, respectivamente). La mayoría de las cepas expresaron resistencia a otros grupos de antibióticos: sulfamidas (98%), trimetoprim (96%), estreptomicina (96%), tetraciclina (93%), ácido nalidixico (73%), y solo un porcentaje de ellas a ciprofloxacino, kanamicina, cloranfenicol y gentamicina (49%, 29%, 22%, y 20%, respectivamente). Merece la pena destacar que la resistencia a trimetoprim, estreptomicina o sulfamida no fue expresada en todos los transconjugantes obtenidos (79%, 71% y 41%, respectivamente) a pesar de la presencia de *gene cassettes* de resistencia a estos antibióticos en el integrón asociado a *bla<sub>CTX-M-9</sub>* en estos aislados.

### 3.2.1.2. Identificación de los plásmidos que codifican la producción de CTX-M-9

La transferencia de la resistencia a cefotaxima en los aislados productores de CTX-M-9 por conjugación fue constatada en el 76% de los casos estudiados. El gen *bla<sub>CTX-M-9</sub>* fue localizado mayoritariamente en **plásmidos conjugativos** de un peso molecular comprendido entre 70 y 320 kb, pertenecientes a los grupos de incompatibilidad **IncHI2** (n=26), **IncP1-α** (n=10), **IncFI** (n=4) e **IncI1** (n=1). En cuatro casos no se pudo identificar el grupo de incompatibilidad de los plásmidos que codifican CTX-M-9, ni por PCR ni por hibridación con sondas específicas para los replicones correspondientes a IncP1-α, IncHI2, IncFI e IncI1 (dos plásmidos de aproximadamente 120kb, uno de aproximadamente 70 kb y uno de tamaño indeterminado).

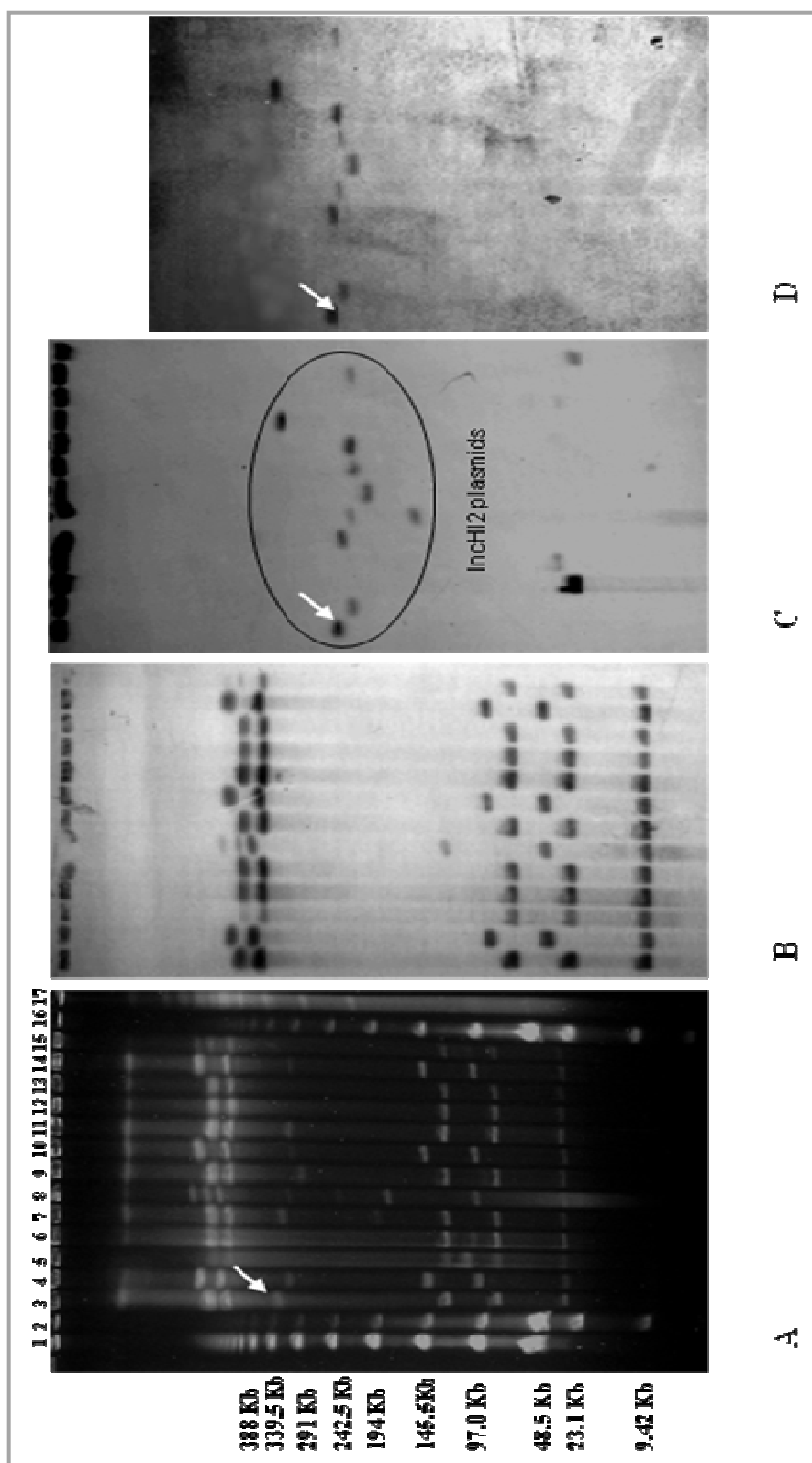
Los **plásmidos** pertenecientes al grupo **IncHI2** fueron aislados de diferentes especies causantes de distintos tipos de infección durante todo el período de estudio (1996-2003) y presentaron un tamaño variable entre 240 y 320 kb. Los similares patrones de huella dactilar de ADN plasmídico de un número representativo de plásmidos IncHI2 obtenidos tras digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI*, y la homología del 99% (un solo cambio nucleotídico) en la región de iterones

amplificada en seis plásmidos IncHI2 de diferentes tamaños con la del plásmido pR478 (prototipo de plásmidos IncHI2, número de acceso a Genbank BX664015), sugiere un origen común a partir de un elemento sometido a diferentes fenómenos de recombinación.

Una gran mayoría de los transconjugantes en los que *bla*<sub>CTX-M-9</sub> se encuentra localizado en plásmidos IncHI2 contenían más de un plásmido (n=19/26) mayoritariamente del grupo IncF. En dos casos, se detectó la presencia de replicones correspondientes a IncHI2 e IncF en una misma banda de ADN correspondiente a los transconjugantes digerido con *I-CeuI*, reflejando probablemente la formación de co-integrados. En uno de los casos, las sondas hibridaron en una misma banda plasmídica de un tamaño de 320 kb, mientras en el otro caso las sondas hibridaron en una banda cromosómica de aproximadamente 330kb, reflejando probablemente la integración del plásmido al cromosoma bacteriano. La caracterización de algunos plásmidos IncHI2 aparece ilustrada en la figura 12.

Los **plásmidos IncP1- $\alpha$**  se aislaron tanto de pacientes ambulantes como de pacientes hospitalizados en áreas médicas entre los años 1998 y 2003. En este caso, todos los plásmidos presentaron un tamaño similar de aproximadamente 100 kb, unos patrones de huella dactilar muy similares e idéntica secuencia del replicon amplificado, que exhibía una homología de 100% con la del plásmido pRK2 (el prototipo de los plásmidos IncP1- $\alpha$ , número de acceso Genbank M20134), reflejando la diseminación de un mismo plásmido a lo largo del tiempo. De forma análoga a lo que ocurre con los aislados productores de CTX-M-9 en los que el gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> está localizado en plásmidos IncHI2, los plásmidos del grupo IncF fueron también identificados en la mayor parte de los aislados en los que el gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> se encuentra localizado en plásmidos IncP1- $\alpha$ .

Aunque la presencia de plásmidos IncF en aislados productores de CTX-M-9 fue frecuente, la localización del gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> en plásmidos de este tipo solamente se detectó en cuatro aislados de los años 2001-2002. Estos plásmidos contenían replicones de tipo repFIB y repFII, tenían un tamaño molecular comprendido entre 140-160 kb y se clasificaron como pertenecientes al grupo IncF. Los amplicones correspondientes al grupo de incompatibilidad IncII fueron también frecuentemente identificados en aislados productores de CTX-M-9 de esta colección (n=11), mayoritariamente en cepas que contenían plásmidos de tipo IncP1- $\alpha$ , aunque su asociación a *bla*<sub>CTX-M-9</sub> fue identificada en un único aislado (120kb).



**Figura 12. Caracterización de plásmidos IncHI2.** A. ADN genómico de aislados productores de CTX-M-9 digerido con *I-CeuI*. Línea 1, marcador  $\lambda$ -ladder PFG (New England Biolabs Inc., Ipswich, EUA); línea 2 y 16, marcador *Low Range* PFG (New England Biolabs, Inc. Ipswich, EUA); líneas 3-15, aislados productores de CTX-M-9; línea 17, marcador *Yeast Chromosome* PFG (New England Biolabs Inc., Ipswich, EUA). B. Hibridación de ADN genómico digerido con *I-CeuI* con la sonda 16S rADN. C y D. Hibridación de ADN genómico digerido con *I-CeuI* con las sondas *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y *IncHI2*, respectivamente.



### 3.2.1.3. Caracterización de integrones asociados a Tn402

La diversidad de integrones de clase 1 asociados a *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y su relación con Tn402 fue investigada por PCR y posterior secuenciación de los fragmentos analizados (figura 13, figura 23). Los integrones fueron clasificados en 6 tipos o variantes designadas con letras mayúsculas (A-F) en base a la secuencia conocida de In60 (número de acceso GenBank AF174129) y en 8 subtipos designados con números (1-8) en base al contenido en IS1326, IS1353, IS6100 y orf5, que refleja la asociación de las variantes de In60 a los distintos derivados de Tn402 conocidos (tabla 7):

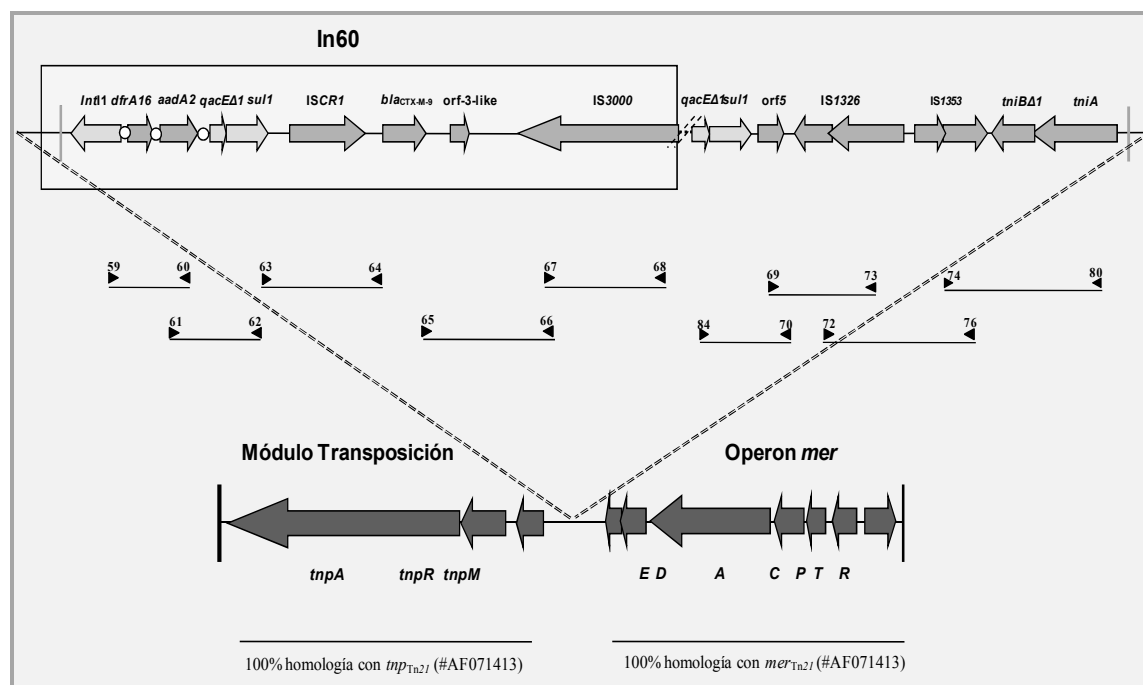
- Tipo A, análogo al prototipo In60 (n=35). La secuencia de la parte variable de este integrón (*dfrA16-aadA2*) es idéntica a la del integrón (In36) identificado en aislados portadores de *qnrA* descritos en China y América del Norte en 2003 (número de acceso Genbank AY259085, 483)
- Tipo B, con diferencias en las secuencias localizadas río abajo de *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (n=4)
- Tipo C, con un contenido de *gene cassettes* diferente al de In60 (n=3). La secuencia de la parte variable (*aadA1*) es idéntica a la del integrón de Tn21, descrito en 1957 (número de acceso Genbank AF071413)
- Tipo D, con un contenido de *gene cassettes* diferente al de In60 (n=1). La secuencia de la parte variable (*dfrA12-orfX-aadA8*) es idéntica a la del integrón identificado en aislados fecales humanos de Australia en 2005 (162)
- Tipos E y F, con presuntas delecciones de la zona 5'CS-3'CS (n=2)

El análisis de la región 3'-CS2 de estos integrones por PCR solapantes y secuenciación de regiones específicas permitió identificar las variantes de Tn402 correspondientes a los integrones tipo In2 (presencia de IS1326 y de IS1353) e In0 (presencia de IS1326), correspondientes a los subtipos 1 y 2 respectivamente (61). Los aislados que mostraron ausencia de orf5 fueron analizados para comprobar la presencia del módulo completo de Tn402 (*tniR-tniQ-tniB-tniA*), previamente descrito en plásmidos contemporáneos de distintos grupos de incompatibilidad como IncP1- $\alpha$  y/o diferentes transposones mercuriales como Tn5058 (295, 447, 455), no habiéndose encontrado en ninguno de los analizados.

**Tabla 7.** Caracterización de variantes de integrones de clase 1 por PCR solapantes basadas en la estructura de In60 y de secuencias relacionadas con Tn402

Tipo <sup>a</sup>	Subtipo <sup>b</sup>	Aislados n=12	Amplificación de productos de PCR con cebadores específicos					Presencia de <i>orf</i> asociadas a integrones de clase 1			
			P59-P60 <sup>c</sup>	P61-P62	P63-P64	P65-P66	P67-P68	IS1326	IS1353	IS6100	orf5
A	1	n=12	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	2	n=4	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	3	n=2	+	+	+	+	+	-	-	-	+
	4	n=15	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	5	n=1	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	6	n=1	+	+	+	+	+	-	-	+	-
B	3	n=3	+	+	+	+	-	-	-	-	+
	4	n=1	+	+	+	+	-	-	-	-	-
C	1	n=1	+ <sup>d</sup>	+	+	+	+	+	+	-	+
	2	n=1	+ <sup>d</sup>	+	+	+	+	+	-	-	+
	7	n=1	+ <sup>d</sup>	+	+	+	+	+	+	-	-
D	8	n=1	+ <sup>d</sup>	+	+	-	-	+	+	+	-
E	4	n=1	-	-	+	+	+	-	-	-	-
F	4	n=1	-	-	-	+	+	-	-	-	-

<sup>a, b</sup> Tipos y subtipos de In60 identificados de acuerdo con diferencias en el contenido en *gene cassettes* en la region 5'CS-3'CS, en las secuencias río abajo de *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y variaciones en el módulo *tni*; <sup>c</sup> Cebadores diseñados en base a la secuencia de In60 (tabla 12); <sup>d</sup> Tamaño de la zona variable del integrón diferente al esperado.



**Figura 13.** Representación esquemática del elemento que contiene *bla*<sub>CTX-M-9</sub>. Las barras verticales representan secuencias repetidas invertidas (IR) del integrón In60 (gris) o del transposón Tn21 (negro). Los círculos representan las secuencias de 59pb de los *gene cassettes* correspondientes. Los cebadores se incluyen en la tabla 12.

La caracterización del **promotor del gen *intI1* (integrasa)** en aislados representativos de cada tipo de integrón reveló la presencia de dos promotores diferentes que presuntamente dirigen la transcripción de los *gene cassettes*. Estos promotores son homólogos a los de los integrones In28 e In4, tradicionalmente conocidos como variantes débil y fuerte, respectivamente (347).

La **región intergénica *sulI-ISCRI*** de 405 pb descrita en otros integrones de clase 1 que contienen *ISCRI* como In35, In37, In38 o In117 (números de acceso Genbank AY079169, AY259086, AY162283 y DQ125241, respectivamente) fue detectada en todos los aislados estudiados. La **secuencia río abajo a IS3000** no pudo ser identificada, aunque la hibridación positiva con sondas correspondientes a secuencias intragénicas de IS3000 y de Tn402/*tni* en un único fragmento de ADN correspondiente a alguno de los aislados estudiados indica la presencia de estos dos fragmentos en un mismo elemento genético (datos no mostrados).

Las regiones río abajo y río arriba del gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> en aislados correspondientes a los subtipos designados como 4, 5, 7 y 8 según nuestro esquema de PCR solapadas no pudieron ser determinadas, aunque la región *tniB-tniA* fue amplificada en dos aislados del subtipo 4 (In60E-4 e In60F-4) localizada en plásmidos del grupo de incompatibilidad IncHI2. Estas secuencias fueron idénticas a las de Tn5058, un transposón mercurial derivado de Tn5053 (número de acceso Genbank Y17897), aunque su asociación con In60 no pudo ser establecida.

#### 3.2.1.4. Asociación del In60 al Tn21

La presencia de *merA*, observada en el 47% de los aislados sugirió inicialmente una posible relación de In60 con transposones mercuriales de la familia Tn21, ampliamente distribuidos en *Enterobacteriaceae* (256). La presencia del brazo izquierdo completo del transposón Tn21 (*tnpA-tnpR-tnpM*) fue identificada en aislados correspondientes a los tipos In60 A-1, B-3, C-1 y C-2, asociados a plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncP1- $\alpha$  e IncHI2 aunque fue variable en aislados portadores de la variante de In60 B-3. La presencia del brazo derecho del transposón (operon *mer*) fue detectada en todos los aislados en los que *bla*<sub>CTX-M-9</sub> se asoció a plásmidos IncP-1 $\alpha$ , en un número variable en los que estaba asociada a plásmidos IncHI2, estando ausente cuando el gen se localizó en plásmidos IncFI.

### 3.2.2. Epidemiología molecular de la resistencia mediada por TEM-24

*Se han descrito más de 100 variantes de enzimas de tipo TEM desde la primera descripción de CTX-1 (TEM-3) en 1984 (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>), las cuales derivan de TEM-1 y TEM-2 por mutaciones puntuales. Algunas variantes (TEM-3, TEM-4, TEM-10, TEM-24, TEM-52) se encuentran ampliamente diseminadas en humanos y animales de consumo alimentario de determinadas áreas geográficas habiendo causado brotes epidémicos en el ámbito hospitalario y/o comunitario (10, 23, 87, 95, 115, 117, 268, 360).*

*TEM-24 constituye una de las BLEE de tipo TEM más frecuentemente identificadas en hospitales de diferentes países de Europa. Su amplia diseminación se ha relacionado principalmente con la dispersión de un clon de *E. aerogenes* resistente a múltiples antibióticos causante de infecciones de adquisición nosocomial aunque también se ha detectado en otras especies como *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *P. rettgeri*, *Aeromonas* sp., y *P. aeruginosa* (115, 165, 275, 276, 277, 311, 312).*

*En el presente estudio se analizaron a nivel molecular aislados de enterobacterias productoras de TEM-24 en hospitales de España, Portugal, Francia y Bélgica (1998-2004).*

Estos resultados forman parte del manuscrito “*A multi-resistant IncA/C<sub>2</sub> plasmid containing Tn21 y Tn1696 derivatives causes international spread of TEM-24 among Enterobacteriaceae*” (en preparación) (ver anexo página 169). Presentado en el 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, Abril 2008.

#### 3.2.2.1. Estructura poblacional de los aislados productores de TEM-24

Los 28 aislados productores de TEM-24 analizados fueron identificados como *E. aerogenes* (n=13), *E. coli* (n=6), *K. pneumoniae* (n=6), *P. mirabilis* (n=2) y *K. oxytoca* (n=1). Los aislados de *E. aerogenes*, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis*, correspondían a pulsotipos únicos mientras que los de *E. coli* fueron genéticamente diversos: 6 pulsotipos correspondientes a los grupos filogenéticos D (n=4) y A (n=2) (tabla 8). El clon de *E. aerogenes* identificado fue idéntico al previamente detectado en algunos hospitales de España, Portugal, Francia y Bélgica (72, 115, 117, 154, 268), indicando la dispersión clonal de esta cepa en diferentes países. Un estudio ha identificado la presencia del clon de *E. aerogenes* en aislados humanos de origen hospitalario no productores de BLEE (130).

Todas las cepas presentaban un patrón de resistencia a cloranfenicol, sulfamidas, trimetoprim, aminoglucósidos (estreptomicina, kanamicina, netilmicina, tobramicina, y reducida susceptibilidad a amikacina), quinolonas (ciprofloxacina y ácido nalidixico), y tetraciclina. Los transconjugantes exhibían un patrón de resistencia a cloranfenicol, sulfamidas, trimetoprim, y la mayoría de ellos a aminoglucósidos (kanamicina, netilmicina y tobramicina). La resistencia a amikacina (71%),

ciprofloxacina (71%), ácido nalidixico (68%), estreptomina (64%), tetraciclina (61%), y gentamicina (3.6%) fue variable y frecuentemente no transferible. Este perfil de multiresistencia observado fue similar al descrito en otros estudios de cepas y/o plásmidos productores de TEM-24 (72, 117, 154, 175, 268, 275, 311).

### 3.2.2.2. Identificación de los plásmidos que codifican la producción de TEM-24

En todas las especies y clones estudiados, el gen *bla*<sub>TEM-24</sub> fue localizado en un plásmido conjugativo del grupo de incompatibilidad IncA/C<sub>2</sub> identificado en base a la secuencia de su origen de replicación (100% idéntica a la del plásmido p2039, número de acceso al Genbank AM087198) y de un tamaño aproximado de 180kb. La similitud en los patrones de huella dactilar de ADN plasmídico de distintas especies de *Enterobacteriaceae* obtenidos por digestión enzimática indican la dispersión de un plásmido común portador del gen *bla*<sub>TEM-24</sub> en España, Portugal, Francia y Bélgica. La identificación del mismo plásmido en aislados de diferentes especies (*E. coli* y *E. aerogenes*) del mismo paciente, indica también una eficiente transferencia *in vivo* de este elemento genético, fenómeno que ha sido observado en otros estudios donde se han aislado diferentes especies de *Enterobacteriaceae* (*E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *S. marcescens*, *C. freundii* y *Aeromonas* sp.) (275, 276, 277, 311, 312).

### 3.2.2.3. Caracterización de integrones y su asociación con derivados de Tn402 y Tn21

La presencia de integrones y transposones y su relación con la resistencia a distintos antibióticos fue investigada por PCR y posterior secuenciación de los fragmentos obtenidos en los transconjugantes (ver materiales y métodos apartado 7.1.9.3, 268).

Se identificaron tres tipos de **integrones de clase 1** de 0.8kb (tipo VII) y de 1.2kb (tipos II y XVI) en transconjugantes representativos de distintos clones cuyo contenido en *gene cassette* explicaría la resistencia a trimetoprim (*dhfr*), estreptomina (*aad*), cloranfenicol (*cmlA1*) y de los aminoglucósidos kanamicina, netilmicina, tobramicina y amikacina (*aacA4*):

- i) Tipo VII (*aacA4*, también designado *aac6'-Ib* o 6'-N-acetiltransferasa). Su secuencia es 99% homóloga al del integrón del primer plásmido de resistencia a antibióticos pSa (designado también como NR1 o R100 y prototipo de los plásmidos del grupo de incompatibilidad FII) identificado en *S. flexneri* en el año 1957 y ampliamente diseminado en plásmidos contemporáneos de distintos grupos de incompatibilidad (número de acceso Genbank L06822)
- ii) Tipo XVI (*aacA4-cmlA1*). La secuencia del gen *aacA4* fue distinta a la descrita anteriormente (3 cambios nucleotídicos), y a su vez también 99% homóloga a la del prototipo presente en el plásmido pSa (número de acceso Genbank L06822). La de *cmlA1* fue 99% homóloga al encontrado en el integrón de clase 1 In4 (número de acceso Genbank U12338)

- iii) Tipo II (*dfrA1-aadA1*). La secuencia fue 99% homóloga a otras en el Genbank; la secuencia de *aadA1* es idéntica a la que se encuentra localizada en el integrón de clase 1 In2 en el Tn21 (número de acceso Genbank AF071413)

Estos integrones fueron identificados como parte de **variantes defectivas de Tn402 de la familia In0-In2-In5** (*aacA4-cmlA1* o *dfrA1-aadA1*) y de la **familia In4** (*dfrA1-aadA1* o *aacA4*), en base a la secuencia del promotor del gen *intI1* y del módulo *tni*<sub>Tn402</sub> (figuras 15 y 23, 347). Las diferencias en el número y/o contenido de los *gene cassettes* justificarían ligeras variaciones en el perfil de sensibilidad observado en distintos aislados. La región río abajo de 3'CS, *tniB-tniA*, IRi e IRt de los Tn402 de tipo In0 fueron idénticas a las del plásmido pVS1, un plásmido no-conjugativo de *P. aeruginosa* y que contiene el transposón mercurial Tn501 (61, 439).

La caracterización detallada de la región río abajo de 3'CS del Tn402 clasificado como de la familia In4 permitió identificar una nueva variante, en la cual parece haberse deletado la primera copia de IRt del integrón y la copia de la secuencia  $\Delta$ IS6100, localizadas río arriba y río abajo de la copia completa de IS6100 respectivamente en el prototipo In4 (número de acceso GenBank U12338). Esto podría indicar la importancia de los fenómenos de recombinación y delección en la diversificación de miembros de esta familia, como indican estudios anteriores para otros elementos (237, 346, 348).

**Las variantes de Tn402** fueron caracterizadas en detalle en dos transconjugantes de *E. coli*, demostrándose su asociación con transposones mercuriales de la familia Tn21 (figura 14).

- **El Tn402 de la familia In0** fue identificado en un derivado de Tn21 cuyos módulos de *tni* y de operon *mer* tenían una secuencia 100% idéntica a la del Tn21 de los plásmidos de multirresistencia NR1 o R100 (IncFII) y pHCM1 (IncHI1) (256, 342, números de acceso Genbank AP000342 y AL513383, respectivamente).
- **El Tn402 de la familia In4** fue asociado a distintos entornos genéticos en las cepas analizadas. En uno de los casos, esta variante correspondió a un transposón derivado de Tn21 compuesto de un módulo *tnp* idéntico al de Tn21 (número de acceso Genbank AF071413) y de un operon *mer* idéntico al del transposón Tn1696 (número de acceso Genbank U12338). En otro aislado, la variante de In4 fue asociada al transposón Tn1696, cuyos módulos *mer*<sub>1696</sub> y *tnp*<sub>1696</sub> son idénticos a los del Tn1696. El *tnp*<sub>1696</sub> aparece truncado por la inserción de un transposón TnI, compuesto por el gen *bla*<sub>TEM-24</sub> y los genes *tnpA* y *tnpR*, que mostraron 100% homología a los del TnI (número de acceso GenBank L27758).

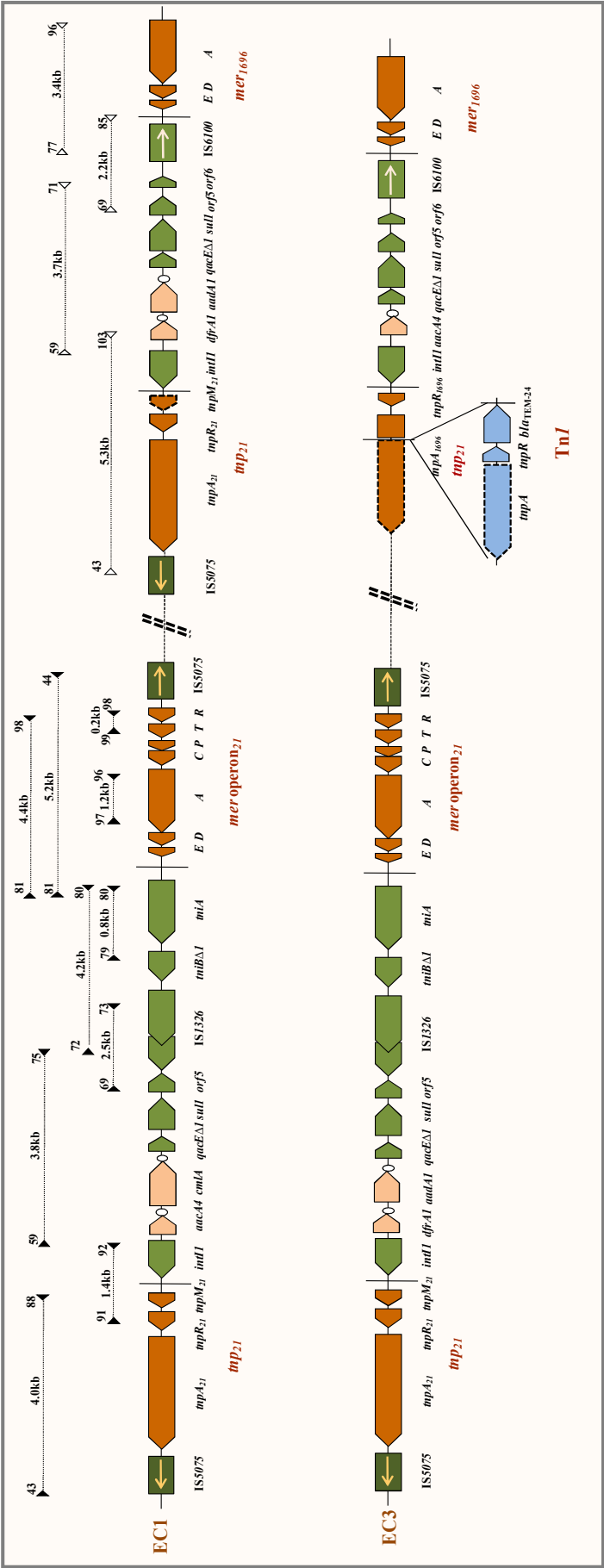
En los extremos terminales de Tn21 y truncando las IR del transposón se identificó la secuencia de inserción IS5075, perteneciente a la familia IS1111 (343). Estas ISs se insertan dentro o fuera de las secuencias invertidas terminales (38pb) de los transposones mercuriales de la familia Tn21, habiéndose sugerido un papel determinante en la movilidad de estos elementos (343, 459). Las secuencias fueron idénticas a las descritas en un transposón derivado de Tn1721 encontrado en *A. baumannii* (número de acceso Genbank AY196695) y 99% homóloga a variantes descritas en otros plásmidos de tipo IncA/C<sub>2</sub> (pCC416), IncFII (pRMH760) e IncHII (pHCM1) (números de acceso Genbank AJ704863, AY123253 y AL513383, respectivamente) (89, 342, 344).

**La asociación entre Tn21 y Tn1696** formando parte de un elemento modular de mayor tamaño no puede ser descartada. La presencia de elementos de resistencia que incluyen estos dos transposones ha sido observada en plásmidos de los primeros aislados resistentes a antibióticos (309, 344).

Otro elemento genético relacionado con el fenotipo de resistencia a antibióticos de este plásmido fue el gen *sul2*, cuya asociación a entornos genéticos conocidos (ISCR2-*sul2* o derivados de Tn5053 o al plásmido RSF1010) ampliamente distribuidos entre plásmidos conjugativos y no-conjugativos no pudo ser verificada (386, 460,).

En resumen, la diseminación de *bla*<sub>TEM-24</sub> en diferentes países está causada por la dispersión de cepas epidémicas de *E. aerogenes*, *K. pneumoniae* o *P. mirabilis*, así como de un plásmido epidémico de amplio espectro perteneciente al grupo de incompatibilidad IncA/C<sub>2</sub>. El fenotipo de multiresistencia observado ha sido asociado a plataformas genéticas conocidas (derivados de Tn402 y transposones mercuriales) ampliamente distribuidas en plásmidos de distintos grupos de incompatibilidad, indicando su importancia en la diseminación de la resistencia a antibióticos en nuestro entorno.

**Figura 14.** Elementos de resistencia a antibióticos caracterizados por ensayos de PCR solapados en plásmidos IncA/C<sub>2</sub> que codifican TEM-24



La caracterización de estos elementos se efectuó en los transconjugantes de *E. coli* EC1 y EC3 (tabla 8). Las líneas interrumpidas indican regiones no completamente secuenciadas. Los cebadores se incluyen en la tabla 11.



**Tabla 8.** Datos epidemiológicos y caracterización plasmídica de aislados de *Enterobacteriaceae* multi-resistentes productores de TEM-24

Especie	Pulso-tipo <sup>a</sup>	Nº aislado	Fecha	Origen	Unidad	Muestra	Perfil de resistencia <sup>b</sup>	Tamaño del plásmido (Kb) <sup>c</sup>	Grupo Inc Plásmido <sup>d</sup>	Patrón huella dactilar
<i>E. aerogenes</i>	<u>EAZ</u>	8 <sup>e,f</sup>	11/98-07/04	España (n=5) Francia(n=2) Portugal (n=1)	UCI-Médica (n=2) Neurocirugía-UCI Medicine Interna Ambulante Nefrología	Catéter (n=2) Sangre (n=3) Herida (n=1)	(Ak), Cp, Cm, Km, Na, Nt, (Sm), Su, Te, Tb, Tp	180	A/C <sub>2</sub>	A
<i>E. aerogenes</i>	<u>EAZ<sub>A1</sub></u>	2	10/99-12/99	España	UCI-cardiovascular Broncoscopia	Herida BAS	(Ak), Cp, Cm, Km, Na, Nt, (Sm), Su, Te, Tb, Tp	180	A/C <sub>2</sub>	A
<i>E. aerogenes</i>	<u>EAZ<sub>A3</sub></u>	3	11/02-12/02	Portugal (n=2) Francia (n=1)	Fisiatría (n=1) Medicina Interna (n=1) Nefrología (n=1) Unidad de Quemados (n=3)	Orina (n=2) Sangre (n=1)	(Ak), Cp, Cm, Km, Na, Nt, (Sm), Su, (Te), Tb, Tp	180	A/C <sub>2</sub>	A
<i>K. pneumoniae</i>	<u>KP8</u>	6	03/03-04/03	Portugal	Urología (n=1) Nefrología (n=1) Cirugía (n=1)	-	(Ak), Cm, Km, (Nt), (Sm), Su, (Te), Tb, Tp	180	A/C <sub>2</sub>	A
<i>P. mirabilis</i>	<u>PM1</u>	2	01/03-04/03	Portugal	Neurocirugía (n=1) UCI-Médica (n=1)	Orina (n=2)	Ak, Cp, Cm, (Km), Na, (Nt), Sm, Su, Te, (Tb), Tp	180	A/C <sub>2</sub>	A
<i>E. coli</i>	<u>EC1</u>	1 <sup>e</sup>	12/99	España	Ambulante	Sangre	Ak, Cp, Cm, Gm, Km, Na, Nt, Sm, Su, Tb, Tp	180	A/C <sub>2</sub>	A
<i>E. coli</i>	<u>EC2</u>	1	03/00	España	Ambulante	Sangre	Cp, Cm, Km, Na, Nt, Sm, Su, Te, Tb, Tp	180	A/C <sub>2</sub>	A
<i>E. coli</i>	<u>EC3</u>	1 <sup>e,f</sup>	06/02	España	Medicina Interna	Orina	Cp, Cm, Km, Na, Su, Tb, Tp	180	A/C <sub>2</sub>	A
<i>E. coli</i>	<u>EC4</u>	1 <sup>f</sup>	06/02	España	Neurocirugía	Respiratoria	Ak, Cp, Cm, Km, Nt, Sm, Su, Tb, Tp	180	A/C <sub>2</sub>	A
<i>E. coli</i>	<u>EC5</u>	1	03/03	Portugal	Paramiloidosis	Orina	Ak, Cp, Cm, Km, Na, Nt, Sm, Su, Te, Tb, Tp	180	A/C <sub>2</sub>	A
<i>E. coli</i>	<u>EC6</u>	1	03/03	Portugal	Neonatología	Sangre	Ak, Km, Nt, Sm, Su, Te, Tb, Tp	180	A/C <sub>2</sub>	A
<i>K. oxytoca</i>	KO1	1	03/04	Portugal	Neonatología	-	Km, Nt, Su, Tb, Tp	180+151+32	A/C <sub>2</sub>	ND

<sup>a, b</sup> La transferibilidad de *bla*<sub>TEM-24</sub> o de la resistencia a un dado antibiótico está representada como caracteres subrayados; <sup>c</sup> El tamaño plasmídico fue determinado por hibridación de ADN genómico de los transconjugantes digerido con S1 nucleasa con las sonda *bla*<sub>TEM-24</sub>; <sup>d</sup> El grupo de incompatibilidad de los plásmidos fue identificado por un esquema de *rep*-PCR y confirmación por hibridación de ADN genómico digerido con S1 nucleasa con una sonda intragénica *IncA/C<sub>2</sub>*; <sup>e</sup> Aislados seleccionados para la caracterización de los elementos de resistencia; <sup>f</sup> Aislados de *E. coli* y *E. aerogenes* fueron aislados del mismo paciente (dos casos); Abreviaturas: Ak=amikacina; Cp= ciprofloxacino; Cm= cloranfenicol; Gm=gentamicina; Km= kanamicina; Na= ácido nalidixico; Sm=estreptomicina; Su= sulfonamidas; Te= tetraciclina; Tb= tobramicina; Tp=trimetoprim. UCI= unidad de cuidados intensivos;

### 3.2.3. Epidemiología molecular de la resistencia mediada por enzimas de la familia CTX-M-1

*Los enzimas del grupo CTX-M-1 (CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -28, -29, -30, -32, -33, -34, -36, -37, -42, -52, -53, -54, -55, -58, -60, -61, -66; -68) constituyen las cefotaximasas más frecuentemente detectadas en todos los continentes debido a la diseminación pandémica de variantes específicas como CTX-M-1, CTX-M-3 o CTX-M-15.*

*Los genes que codifican las enzimas de este grupo se encuentran asociados a ISEcP1 (239, 375), con la excepción de bla<sub>CTX-M-10</sub> de aislados españoles descrito en un elemento genético relacionado con fagos (329). Algunos de estos genes se encuentran ampliamente diseminados habiéndose descrito brotes epidémicos de aislados productores de CTX-M-1, CTX-M-3 o CTX-M-15 en distintas regiones geográficas (19, 45, 289, 314). Otras, como CTX-M-32, están muy relacionadas con brotes epidémicos en animales y el compartimento extrahospitalario (56, 337).*

*Los aislados productores de CTX-M pertenecientes al grupo CTX-M-1 fueron detectados por primera vez en España en nuestra institución en 1991 y correspondían al enzima CTX-M-10 (328). Hasta 2000 no se detectaron otras variantes de este grupo, que fueron identificadas como CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-15 y CTX-M-32 en distintos hospitales simultáneamente (este estudio, 80, 337, ver figura 8).*

*La caracterización del entorno de los genes que codifican su producción y la identificación de los plásmidos que los vehiculan permitió confirmar el papel fundamental de los plásmidos conjugativos de los grupos de incompatibilidad clásicos en la diseminación de genes que codifican la producción de enzimas del grupo CTX-M-1, demostrándose una asociación de cada una de estas BLEE a plásmidos específicos: CTX-M-32 e IncN, CTX-M-1 e IncL/M, CTX-M-3 e IncA/C<sub>2</sub> y CTX-M-15 e IncFII.*

A partir de este estudio se originaron dos publicaciones (ver anexo página 169)

*“Emergence and dissemination of CTX-M-1-like-producing Enterobacteriaceae in Spain is caused by IncFII (CTX-M-15) and broad host range (CTX-M-1,-3,-32) plasmids”. 2007. Antimicrob Agents Chemother. 51(2): 796-9”*

*“Dissemination of clonally related Escherichia coli strains expressing the extended spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15”. 2008. Emerging Infectious Diseases. 14(2): 195-200”*

### 3.2.3.1. Epidemiología de aislados productores de enzimas tipo CTX-M-1, -3, -32

Dieciséis aislados de *E. coli* productores de CTX-M-1 (n=9), CTX-M-3 (n=1) y CTX-M-32 (n=5) identificados en nuestra institución entre 2000 y 2002 y en Polonia, productor de CTX-M-3, (1996) fueron clasificados en 10 pulsotipos correspondientes a CTX-M-32 (n=5), CTX-M-1 (n=3) y CTX-M-3 (n=2). La mayoría de estos aislados se asignaron a los grupos filogenéticos B2 y D asociados a *E. coli* patógenos extraintestinales y al compartimento hospitalario (B2, 44.4%; D, 33.3%), mientras los filogrupos A y B1, relacionados a *E. coli* comensales de humanos o animales representaron el 11.1% cada uno.

Los **aislados productores de CTX-M-32** fueron identificados como *E. coli* de los grupos filogenéticos: A (n=1), B1 (n=1), B2 (n=1) y D (n=2) y expresaron resistencia a cefalosporinas de tercera generación, tetraciclina (80%), ácido nalidíxico (60%) y sulfamidas (40%).

Un único plásmido de 40kb de tipo IncN con un replicon idéntico al del plásmido R46 (prototipo de los plásmidos del grupo de incompatibilidad IncN, número de acceso Genbank AY046276) fue identificado en todos los aislados estudiados.

Los **aislados productores de CTX-M-1** fueron identificados como *E. coli* de los grupos filogenéticos B2 (n=2, 66.7%) y D (n=1, 33.3%). Una cepa epidémica de *E. coli* perteneciente al filogrupo B2 fue identificada en la UVI de cardiopediatría de nuestro hospital durante un período de 11 meses (2001-2002). Además, dos aislados con pulsotipos diferentes fueron recuperados de un mismo paciente. Estos aislados expresaron resistencia a cefalosporinas de tercera generación, estreptomicina, trimetoprim y sulfamidas.

El gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub> fue localizado en plásmidos de los grupos IncL/M (n=2) e IncN (n=1). El replicon del plásmido IncL/M (50kb) presentaba un 99% de homología con el del plásmido de referencia pMU604 de *K. pneumoniae* (número de acceso Genbank U27345). El plásmido IncN (40kb) que contiene *bla*<sub>CTX-M-1</sub> tenía un patrón de huella dactilar idéntico al del plásmido IncN que contiene *bla*<sub>CTX-M-32</sub>. La identificación de un entorno genético común respecto al plásmido y la secuencia río arriba de los genes *bla*<sub>CTX-M-1</sub> y *bla*<sub>CTX-M-32</sub> (*ISEcpI-IS5-bla*<sub>CTX-M</sub>) parece indicar un origen común para estos dos genes y la evolución *in vivo* del plásmido, como parece haber ocurrido en otros contextos (*bla*<sub>CTX-M-3</sub> y *bla*<sub>CTX-M-15</sub>) (206).

Los **aislados productores de CTX-M-3** estudiados procedentes de España y Polonia, mostraron distintos perfiles de sensibilidad. El aislado recuperado en nuestra institución fue asociado al grupo filogenético B2 y confería resistencia a ácido nalidíxico, mientras el transconjugante portador de *bla*<sub>CTX-M-3</sub> de Polonia fue resistente a aminoglucosidos, sulfamidas y trimetoprim.

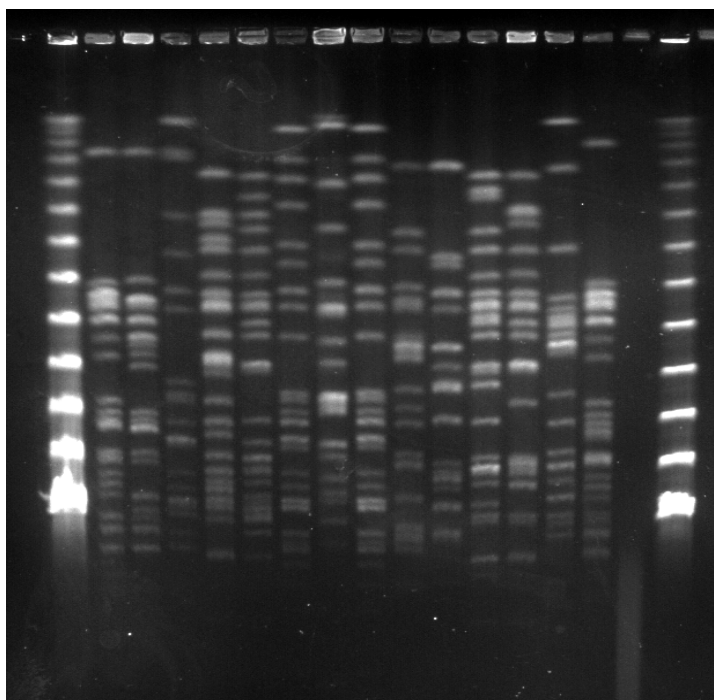
El gen *bla*<sub>CTX-M-3</sub> se asoció a plásmidos de los grupos IncA/C<sub>2</sub> (120kb, España) e IncL/M (170kb, Polonia). La secuencia del replicón del aislado español fue idéntica a la del plásmido p2039 de *S. enterica* aislado en los Estados Unidos en 1997 (número de acceso Genbank AM087198), que se

diferencia de la del prototipo IncA/C<sub>2</sub> (plásmido RA1, número de acceso Genbank X73674) en 27 nucleótidos/3 aminoácidos respecto al plásmido de referencia.

### 3.2.3.2. *Epidemiología de aislados productores de CTX-M-15*

Cincuenta y dos aislados clínicos (44 *E. coli*, 8 *K. pneumoniae*) y 6 plásmidos productores de CTX-M-15 procedentes de 7 países de distintos continentes (Francia, España, Portugal, Suiza, India, Kuwait y Canadá) fueron estudiados (2000-2005). Los aislados de *E. coli* se agruparon en los filogrupos B<sub>23</sub> (n=22, 50%), D<sub>1</sub> (n=11, 25%), A<sub>1</sub> (n=8, 18%) y B<sub>1</sub> (n=3, 7%). Los subgrupos B<sub>23</sub>, A<sub>1</sub> y D<sub>1</sub> son los más frecuentes dentro de los grupos filogenéticos B2, A y D, respectivamente.

Se identificaron 32 pulsotipos de *E. coli* (B<sub>23</sub>, n=13; D<sub>1</sub>, n=10; A<sub>1</sub>, n=6; B<sub>1</sub>, n=3). Entre los 13 pulsotipos del grupo filogenético B2, 9 de ellos (correspondientes a 18 aislados de Francia, Canadá, España, Portugal, Kuwait y Suiza) presentaron patrones de huella dactilar con ≤6 bandas de diferencia y una similitud ≥ 80% que sugirió una relación clonal (ver figura 15). Todos ellos fueron asignados a la secuencia tipo (ST) ST131. Los otros cuatro pulsotipos B2 (n=5 aislados) fueron identificados como ST695 (un aislado de Francia), ST28 (un aislado de Suiza), ST354 (un aislado de España y otro de Portugal) y ST405 (un aislado de Portugal). La mayoría de los aislados de *E. coli* B<sub>23</sub> (n=16) correspondían a aislamientos de orinas, de los cuales todos excepto 3 pertenecieron al ST131. Cuatro de los aislados B<sub>23</sub> fueron identificados en muestras de heridas (n=2) correspondientes a los ST354 y ST28, respiratoria (n=1) y en heces (n=1), ambas identificadas como ST131.



**Figura 15. Discriminación de aislados productores de CTX-M-15.**  
Líneas 1 Y 17, marcador  $\lambda$ -ladder PFG (New England Biolabs Inc., Ipswich, EUA); líneas 2-16, digestiones de ADN genómico con *Xba*I.

Los 11 aislados pertenecientes al filogrupo D<sub>1</sub> presentaron una gran diversidad de patrones de macrorrestricción utilizando la técnica de PFGE (11 aislados / 10 pulsotipos). Las secuencias del gen *fumC* fueron identificadas como los alelos 4 (n=1), 13 (n=1), 26 (n=2), 88 (n=1) y 132 (n=1). Ninguna de las variantes de *fumC* identificadas presentó el cambio C288T descrito en *fumC35*, característico del grupo clonal A (CgA) de *E. coli* responsable de infecciones urinarias de origen comunitario (ST69) (209, 451). Cinco aislados procedentes de Kuwait (n=2), Suiza (n=2) y España (n=1) pertenecieron al ST405 (*fumC37*). Todos los aislados de tipo B1 (n=3) fueron detectados en Francia. Se detectó también un clon epidémico de *K. pneumoniae* aislado en 6 pacientes en diferentes unidades y UVI's durante un periodo de 18 meses (desde 2002 hasta 2004).

Las cepas salvajes que producen CTX-M-15 (*E. coli* y *K. pneumoniae*) fueron resistentes a tobramicina (89%), kanamicina (87%), ácido nalidíxico (78%), tetraciclina (69%), gentamicina (69%), estreptomina (58%), ciprofloxacino (54%), trimetoprim (52%), sulfonamidas (50%), cloranfenicol (19%), nitrofurantoína (12%) y amikacina (11%). Todos los transconjugantes expresaron resistencia a cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos, tetraciclina o trimetoprim.

Los aislados productores de CTX-M-15 contenían *bla*<sub>OXA-1</sub> y *aac(6')-Ib-cr* con la excepción de un aislado que solo tenía *aac(6')-Ib-cr* y otro que contenía *bla*<sub>OXA-1</sub> y *aacA4*, lo que determina una reducida susceptibilidad a amikacina, kanamicina y netilmicina.

### 3.2.3.3. Caracterización de los plásmidos que codifican la producción de CTX-M-15

El gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> fue transferido por conjugación o transformación en el 37% de los casos. En 8 aislados de *E. coli* asociados a 7 pulsotipos (3 correspondientes a B2<sub>3</sub>-ST131, uno a D<sub>1</sub>-ST405, dos al filogrupo D<sub>1</sub> y uno al filogrupo A<sub>1</sub>), el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> estaba localizado en el cromosoma, aunque también se identificaron plásmidos de tipo IncFII. En otros dos aislados, la sonda *bla*<sub>CTX-M-15</sub> hibridó tanto en el plásmido IncFII como en el cromosoma (un aislado del grupo D<sub>1</sub>-ST405 y otro del filogrupo B1).

Todos los plásmidos que codifican CTX-M-15 fueron identificados como IncFII a pesar de la diversidad de tamaño (85-160kb), perfiles de huella dactilar y contenido de replicones (FII, FII+FIA, FII+FIA+FIB). Los tres plásmidos mayoritarios fueron arbitrariamente designados plásmido A (85kb), plásmido B (120kb) y plásmido C (85kb) (ver figura 16).

El **plásmido A** (85kb) se identificó en aislados de *E. coli*-B2 de correspondientes a ST131, ST354 y ST405 de cuatro países distintos (India, Francia, Portugal y España). El **plásmido C** (85kb) se identificó entre aislados de *E. coli* de los filogrupos B2 y D no relacionados clonalmente y procedentes de Suiza, Canadá y Francia. El **plásmido B** (120kb) solamente se encontró en *E. coli* del ST131, ampliamente diseminado en todos los países estudiados.

El análisis de las secuencias de replicones permitió identificar cuatro tipos diferentes de repFII designados como repFII(1), repFII(2), repFII(3) y repFII(4):

- i) repFII(1), es el más frecuente (identificado en 23 plásmidos) y su secuencia idéntica a la de los plásmidos R100 y pC15-1a (derivado de R100 contemporáneo), plásmidos multiresistentes ampliamente diseminados en enterobacterias (números de acceso Genbank AP000342 y AY458016, respectivamente)
- ii) repFII(2), detectado en 6 plásmidos. Su secuencia mostró un 99-100% homología con el replicon del plásmido pRSB107, un plásmido de multiresistencia aislado en aguas residuales en Alemania (número de acceso Genbank AJ851089), y un 87% de homología con repFII(1)
- iii) repFII(3), detectado en dos plásmidos. Su secuencia muestra una homología de 98% con la del plásmido pTUC100 (número de acceso GenBank AY091607), asociado a la producción de una microcina y cuyo replicon es similar al del plásmido R100, y un 93% de homología con repFII(1)
- iv) repFII(4), observado en 7 plásmidos. Su secuencia muestra una homología de 96% con la del plásmido p1658/97, responsable por un brote epidémico de aislados de *E. coli* productores de SHV-5 en Polonia (número de acceso GenBank AF550679), y un 96% homología con repFII(1)

El análisis de la región *copA* de estos plásmidos, implicada en la incompatibilidad de los mismos (334), indicó la agrupación de estas secuencias en 3 grupos designados como “a”, “b” y “c”, que se asociaron a los distintos subtipos de plásmidos: “a” y repFII(1), “b” y repFII(2) o repFII(4), y “c” y repFII(3), indicando una probable relación entre los replicones de tipos repFII(2) y repFII(4).

Todas las secuencias de repFIA y repFIB mostraron un grado de homología del 99%-100% con las del plásmido pRSB107 del grupo IncFII (número de acceso Genbank AJ851089).

Los patrones de huella dactilar de plásmidos representativos de cada uno de los tipos de repFII fueron comparados. El análisis bioinformático de los perfiles obtenidos y de las secuencias de los replicones repFII permitieron agrupar los plásmidos en tres grandes grupos (I-III), presentando un grado de similitud superior a 70%:

- Grupo I, comprende la mayor parte de los plásmidos, e incluye los tipos A (85kb) y B (120kb), y la mayoría de los que presentan repFII(1), *copA* de tipo “a”, con un contenido de otros replicones variable.
- Grupo II, en el cual se agrupan solamente los plásmidos de tipo C y sus derivados, que contienen solamente repFII (de tipo variable) y *copA* de tipos “b” y “c”.

- Grupo III, donde se incluyen plásmidos que contienen el replicon repFII(2), *copA* de tipo “b”, y presentan los replicones FIA y FIB (figura 17).

En resumen, el análisis del entorno genético de los genes codificantes de las enzimas del grupo CTX-M-1 refleja una heterogeneidad de las regiones entre *IS<sub>EcPI</sub>-bla* y una asociación de los diferentes genes *bla* con distintos tipos de plásmidos en que están localizados, sugiriendo diferentes eventos de movilización y diseminación a partir de un gen. Aunque menos frecuente, la evolución *in vivo* de determinados genes *bla* parece contribuir también a la diversidad de éstas enzimas como demuestra el caso de *bla*<sub>CTX-M-1</sub> a *bla*<sub>CTX-M-32</sub>. Además, este estudio indica que la diseminación pandémica de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> parece estar relacionada con la dispersión de clones particulares ampliamente distribuidos que pertenecen a los grupos clonales ST131 y ST405 (grupos B2 y D, respectivamente) y a su localización en plásmidos multiresistentes del grupo de incompatibilidad IncFII.

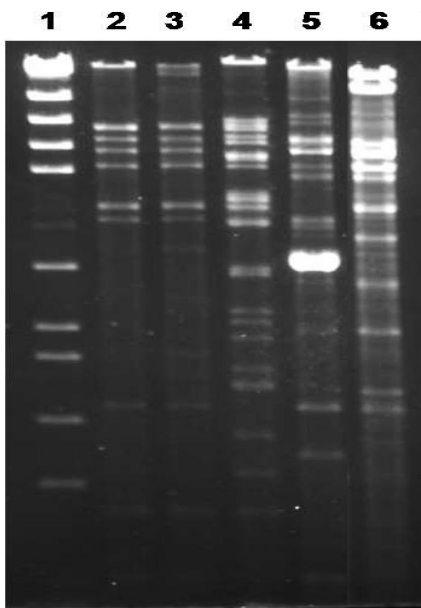


Figura 16. Perfiles de huella dactilar de plásmidos productores de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> tras digestión con *Hpa*I. Patrones representativos de plásmidos IncFII (85kb y 120kb). Línea 1, marcador  $\lambda$ -EcoT14/BglII digest molecular weight (Takara Bio Inc., Shiga, Japón); líneas 2 y 3, pC15-1a (85kb); línea 4, pTUC100 (85kb); línea 5, pRSB107 (120kb); línea A7, pC15-1a (120kb).

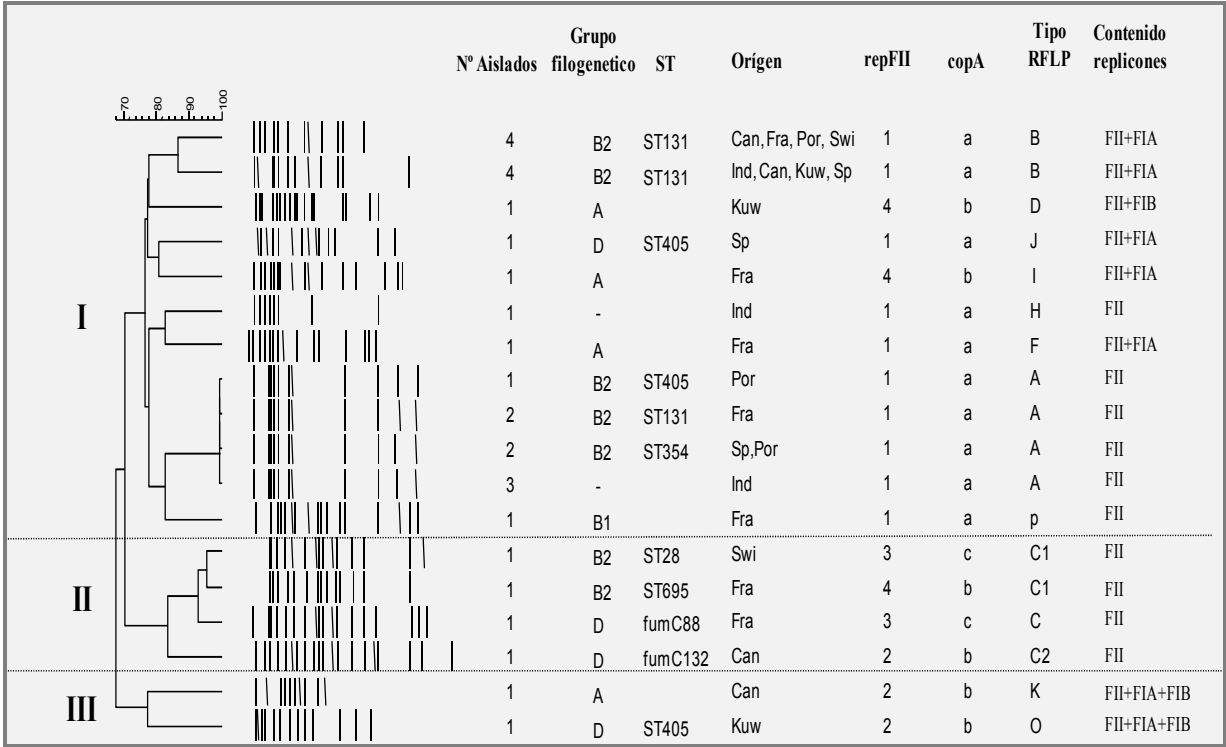


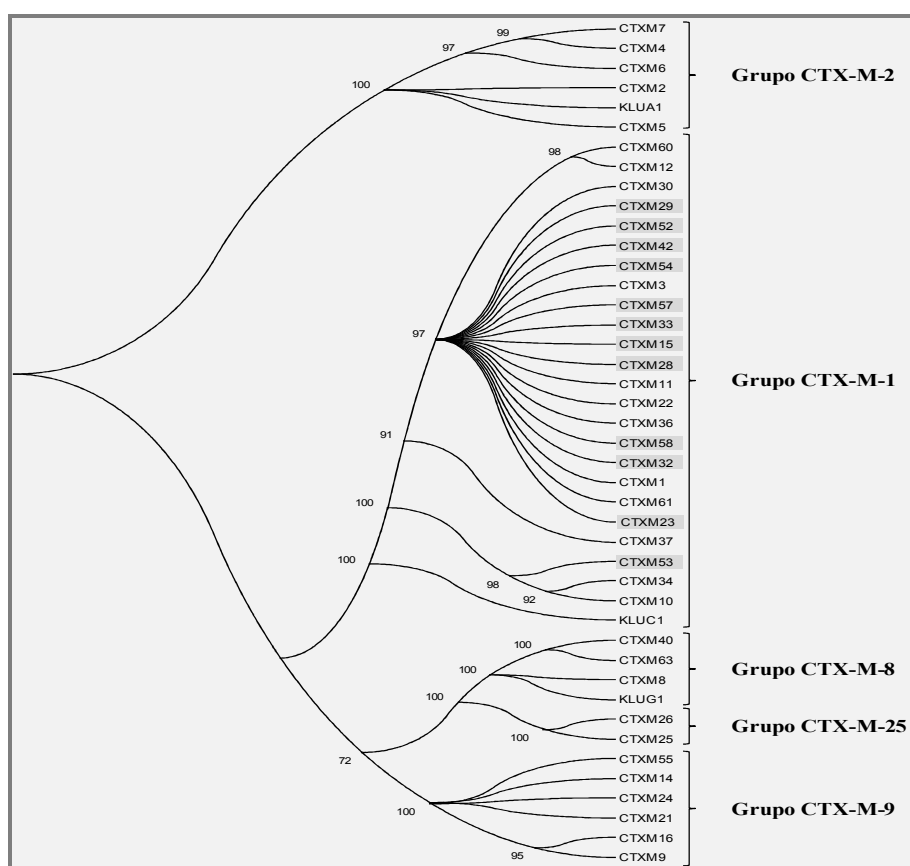
Figura 17. Análisis bioinformático de perfiles de huella dactilar (*Hpa*I) representativos de plásmidos IncFII que contienen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. El análisis se efectuó utilizando la aplicación informática BioNumerics (version 4.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium), aplicando el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA (optimización= 0.5%; tolerancia=1.00%). Abreviaturas: Can=Canadá; Fra=Francia; Ind=India; Kuw=Kuwait; Por=Portugal; Sp=España; Swi=Suiza.



### 3.3. Predicción de la aparición de nuevas variantes CTX-M con mayor resistencia a ceftazidima

La evolución de los enzimas de tipo CTX-M parece depender en gran parte de la localización de los genes correspondientes en elementos genéticos móviles (este estudio). Sin embargo, la acelerada variabilidad observada parece también estar influenciada por la continua exposición de los microorganismos que los albergan a una gran variedad de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, dirigiendo la evolución hacia fenotipos de resistencia más equilibrados y que incluyen una actividad frente a ceftazidima (166, 353). La influencia de la exposición a distintos antibióticos  $\beta$ -lactámicos, en particular a la ceftazidima, fue analizada en las  $\beta$ -lactamasas del grupo CTX-M-1, uno de los que más se ha diversificado y en el cual se incluye un mayor número de variantes presuntamente asociadas a resistencia a este antibiótico (figura 18).

Estos resultados dieron lugar al manuscrito “*Mutational events in ESBL-ceftotaximases of the CTX-M-1 cluster involved in ceftazidime resistance. 2008. Antimicrob Agents Chemother. 52 (7) [Epub ahead of print]*”, (ver anexo página 169)



**Figura 18. Reconstrucción filogenética de enzimas de tipo CTX-M.** Este árbol representa enzimas de los distintos grupos CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25). En gris se señalan las enzimas de tipo CTX-M-1 asociados o presuntamente asociados a resistencia a ceftazidima. La representación ha sido obtenida aplicando los criterios de máxima verosimilitud (Tamura-Nei +I+G) y 500 repeticiones.

### 3.3.1. Evolución *in vitro* de *E. coli* GB20 conteniendo *bla*<sub>CTX-M-1</sub> y *bla*<sub>CTX-M-3</sub>.

La evolución *in vitro* de *E. coli* GB20 (cepa hipermutadora) con pBX3 (plásmido que contiene *bla*<sub>CTX-M-3</sub>) bajo selección con ceftazidima originó el mutante CTX-M-3.1, con el cambio de prolina por serina en la posición 167 (*loop omega*), correspondiente al cambio nucleotídico C<sup>508</sup>→T en el gen *bla*<sub>CTX-M-3</sub>. La cepa de *E. coli* MI1443 (normomutadora) que contiene el gen mutado (*bla*<sub>CTX-M-3.1</sub>) demostró una mayor resistencia a ceftazidima (de 1 a 32 µg/ml), asociada a un gran descenso en la resistencia a cefotaxima y cefepima (de 256 a 1 µg/ml y de 32 a 0.5 µg/ml, respectivamente). La concentración mínima inhibitoria (CMI) a cefuroxima se redujo ligeramente de ≥256 a 128 µg/ml (tabla 9). Un mutante natural que contiene el cambio en la misma posición (P167T) ha sido previamente descrito (CTX-M-42, número de acceso Genbank DQ061159).

El mismo tipo de cambio (P167S) fue también detectado cuando se partió de *E. coli* GB20 portando el plásmido pBX1 (que contiene el gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub>). Los mutantes resultantes fueron CTX-M-1.1, que generó el mayor valor de CMI a ceftazidima de todos los mutantes obtenidos (256 µg/ml, tabla 9) y CTX-M-1.2, con el cambio P167T (prolina por treonina) y que corresponde al mutante natural CTX-M-58 (número de acceso al Genbank EF210159). No se observaron diferencias en los valores de CMI entre *E. coli* MI1443 expresando CTX-M-1.1 y CTX-M-1.2.

Contrariamente a lo esperado, no se obtuvieron las variantes CTX-M-32 y CTX-M-15, derivados resistentes a ceftazidima de CTX-M-1 y CTX-M-3 que presentan la mutación D240G (80, 376). La comparación en un contexto isogénico de variantes que expresaban CTX-M-15 y CTX-M-32, respecto a CTX-M-3 y CTX-M-1 respectivamente, permitió detectar valores de CMI muy similares, incrementándose tan solo 2 veces la CMI a ceftazidima (2 µg/ml) (tabla 9). Probablemente, no fue posible obtener estas variantes en las condiciones experimentales utilizadas dado que el valor de CMI de los correspondientes transformantes (cepas control) fue inferior a la concentración de ceftazidima utilizada en la selección de los mutantes *in vitro* (4 veces la CMI a ceftazidima) (véase sección materiales y métodos, apartado 7.1.10.2).

La evolución *in vitro* del gen *bla*<sub>CTX-M-3</sub> generó un segundo mutante (CTX-M-3.2), que contiene las mutaciones P167S y A77V (alanina por valina) y que se corresponde con la variante natural CTX-M-52 (número de acceso Genbank DQ223685). Este doble mutante confiere a la cepa de *E. coli* MI1443 que lo contiene un valor de CMI a ceftazidima tan elevado como el del mutante CTX-M-3.1 (conteniendo solamente P167S). Sin embargo, se observó una restauración del valor de CMI a cefotaxima (de 1 a 4 µg/ml). Este efecto parece ser mediado por la presencia de la mutación A77V, que ha sido observada previamente en β-lactamasas de tipo CTX-M de diferentes grupos (CTX-M-1, CTX-M-9 y CTX-M-25), indicando la importancia del cambio A77V en la evolución de este grupo de enzimas CTX-M.

### 3.3.2. Mutagénesis dirigida de *bla*<sub>CTX-M-3</sub>.

La **mutación A77V**, correspondiente al cambio nucleotídico C<sup>230</sup>→T fue introducida en el gen *bla*<sub>CTX-M-3</sub> salvaje, originando el mutante CTX-M-3.3. En ausencia de la mutación P167S (presente en el mutante CTX-M-3.2), los valores de las CMI a cefotaxima y a cefepima disminuyeron de 256 a 128 µg/ml y de 32 a 1.5 µg/ml (tabla 10). Este cambio fue observado en la enzima CTX-M-57 (número de acceso al Genbank DQ810789), asociado a la mutación D240G. Esta variante (CTX-M-57) fue construida *in vitro* (CTX-M-3.4) introduciendo el cambio A77V en CTX-M-15, y mostró una actividad frente a cefotaxima y a cefepima parcialmente restaurada (128 a ≥256 µg/ml y de 1.5 a 4 µg/ml, respectivamente), comparando con CTX-M-15. Adicionalmente, la variante natural CTX-M-33, que contiene las mutaciones D240G y N106S (152) fue construida *in vitro*, originando CTX-M-3.7 (tabla 10). La presencia del **cambio N106S** originó un incremento en el valor de CMI a cefotaxima y cefepima (de 128 a ≥256 µg/ml y de 1 a 8 µg/ml, respectivamente), mientras la resistencia a ceftazidima se mantuvo (2 µg/ml). Este patrón se ha observado también cuando se asociaron las mutaciones P167S y N106S (CTX-M-3.6), generándose incrementos en los valores de CMI a cefotaxima (de 1 a 3 µg/ml) y a cefepima (de 0.5 a 1.5 µg/ml), mientras que la resistencia a la ceftazidima se mantuvo (tabla 10). Tal y como fue observado para la mutación A77V, la presencia de N106S en ausencia de D240G (CTX-M-3.5), provocó un descenso en la resistencia a cefotaxima (de 256 a 3 µg/ml) y cefepima (de 32 a 1.5 µg/ml) (tabla 10). Estos resultados indican que el fenotipo de resistencia derivado de la presencia de A77V o de N106S depende de su asociación con las mutaciones P167S o D240G, respectivamente.

Con el objetivo de explicar la ausencia en la Naturaleza de mutantes dobles en las posiciones 167 y 240 en el gen *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, se introdujo la mutación D240G en el mutante CTX-M-3.1 (CTX-M-3+P167S), obteniéndose CTX-M-3.8 (tabla 10). Este mutante mostró un valor de CMI a ceftazidima más bajo que el mutante CTX-M-3.1 (de 32 a 8 µg/ml), indicando un efecto antagónico entre ambos cambios, cada uno capaz de aumentar la resistencia a ceftazidima en ausencia del otro.

### 3.3.3. Evolución *in vitro* de *E. coli* GB20 conteniendo *bla*<sub>CTX-M-10</sub>.

Dos tipos de mutantes derivados de CTX-M-10 con mayor resistencia a ceftazidima fueron obtenidos en los experimentos de evolución *in vitro* de *E. coli* GB20 que contiene *bla*<sub>CTX-M-10</sub>. El mutante CTX-M-10.1, que posee el cambio P167S, demostró un valor más alto de CMI a ceftazidima (de 1 a 32 µg/ml). Resulta interesante señalar que a este aumento estuvo asociado una pérdida de la actividad frente a cefotaxima (256 a 1 µg/ml), cefepima (32 a 1 µg/ml) y cefuroxima (>256 a 32 µg/ml). El otro tipo de mutante obtenido (CTX-M-10.2) contenía la mutación D240G, correspondiente al cambio A<sup>725</sup>→G. El valor de CMI a ceftazidima se incrementó de 1 a 16 µg/ml. Esta substitución ha sido descrita en la naturaleza en la β-lactamasa CTX-M-53, una variante de

CTX-M-10 (número de acceso al Genbank DQ268764). En el mutante CTX-M-10.2 únicamente se ha observado una disminución en el valor de CMI a cefepima (32 a 4 µg/ml) (tabla 9).

### 3.3.4. Mutagénesis dirigida de *bla*<sub>CTX-M-10</sub>.

La presencia de las mutaciones A77V a P167S, mutante CTX-M-10.4, contribuyó a la restauración de la actividad frente a cefotaxima (de 1 a 4 µg/ml) tal y como ha sido observado con *bla*<sub>CTX-M-3</sub> (tabla 10). Por otro lado, el valor de CMI a cefepima se incrementó de 4 a 32 µg/ml cuando se introdujo el cambio A77V en el mutante portador de D240G (CTX-M-10.5). Contrariamente a lo esperado teniendo en cuenta los resultados obtenidos con las variantes de CTX-M-3, la presencia del cambio A77V en CTX-M-10 (CTX-M-10.3) originó un aumento de los valores de CMI a todos los antibióticos, particularmente a ceftazidima y cefepima (de 1 a 8 y de 32 a 128 µg/ml, respectivamente).

En este contexto, la asociación de N106S con P167S (CTX-M-10.7) dio lugar a un ligero descenso en el valor de CMI a ceftazidima (de 32 a 16 µg/ml), pero no afectó significativamente a la sensibilidad a cefotaxima o cefepima. De forma análoga a lo observado en CTX-M-3, la presencia de la mutación N106S en CTX-M-10 (CTX-M-10.6) se tradujo en una reducción de la actividad frente a cefotaxima (de 256 a 2 µg/ml) y cefepima (de 32 a 1 µg/ml). Sin embargo, se observó una disminución de los valores de CMI a cefotaxima y ceftazidima (de  $\geq 256$  a 64 µg/ml, y de 16 a 2 µg/ml, respectivamente) cuando esta mutación se asoció al cambio D240G (CTX-M-10.8) (tabla 10).

El efecto de la presencia simultánea de las mutaciones que afectan la susceptibilidad a ceftazidima, P167S y D240G (CTX-M-10.9), fue explorado, observándose que ambos cambios son fenotípicamente antagónicos, como reflejan la disminución de la CMI a los antibióticos cefotaxima (de  $\geq 256$  a 4 µg/ml), ceftazidima (de 16 a 4 µg/ml) y cefepima (de 4 a  $<0.25$  µg/ml) (tabla 10).

En resumen, la estrategia utilizada para la predicción de nuevas variantes CTX-M parece reproducir los sucesivos eventos de selección natural, habiéndose obtenido enzimas previamente descritas como CTX-M-52 (derivada de *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, número de acceso al Genbank AF488377). Se identificó un fenómeno de *antagonismo pleiotrópico* caracterizado por un aumento de la actividad hidrolítica frente a ceftazidima y una pérdida de resistencia a los demás antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Este trabajo confirmó el papel de los cambios P167S y D240G en el incremento de la resistencia a ceftazidima en miembros del grupo CTX-M-1 (CTX-M-1, CTX-M-3 y CTX-M-10) y/o en el re-equilibrio del fenotipo de resistencia a otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos y demostró por primera vez la implicación de otros cambios (A77V y N106S) en la evolución de miembros de este grupo. Además, la incompatibilidad observada entre las mutaciones P167S y D240G sugiere la existencia de dos rutas evolutivas diferentes que dirigen la evolución hacia fenotipos de resistencia más eficientes.

**Tabla 9.** Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para diferentes antibióticos β-lactámicos de las variantes CTX-M-1 obtenidas en la naturaleza o en experimentos de selección *in vitro*.

Variante CTX-M <sup>a</sup>	Mutante <sup>b</sup>	Antibióticos β-lactámicos											
		Cambios aminoacídicos <sup>c</sup>								Valores de CMI (µg/ml)			
		V27A	Q38R	A77V	N114D	A140S	P167S	D240G	D288N	CTX	CAZ	FEP	CXM
CTX-M-10										256	1	32	≥256
	CTX-M-10.1						+			1	32	1	32
	CTX-M-10.2							+		≥256	16	4	≥256
CTX-M-3		+	+							256	1	32	≥256
	CTX-M-3.1	+	+				+			1	32	0.5	128
	CTX-M-3.2 (=CTX-M-52)	+	+	+			+			4	32	0.25	64
CTX-M-1		+	+	+	+	+			+	≥256	4	128	≥256
	CTX-M-1.1	+	+	+	+	+	+	+		16	256	4	≥256
	CTX-M-1.2 (=CTX-M-58)	+	+	+	+	+	(+) <sup>e</sup>	+		16	256	4	≥256
CTX-M-15		+	+						+	128	2	1	≥256
CTX-M-32		+	+	+	+	+		+	+	256	2	4	≥256

<sup>a</sup> Variantes CTX-M identificadas en un contexto natural. <sup>b</sup> Mutantes CTX-M-1 obtenidos por experimentos de evolución *in vitro*. <sup>c</sup> Cambios aminoacídicos presentes en cada alelo CTX-M en comparación con CTX-M-10 se representan con “+”. <sup>d</sup> Valores de concentración mínima inhibitoria observados para cada antibiótico analizado identificados por microdilución en líquido: CTX= cefotaxima; CAZ= cefazidima; FEP= cefepima; CXM=cefuroxima. <sup>e</sup>La mutación en esta posición corresponde al

**Tabla 10.** Influencia de las substituciones A77V y N106S obtenidas por mutagénesis dirigida sobre la sensibilidad a cefalosporinas de tercera generación en las distintas variantes CTX-M-1

Variante	Mutante <sup>b</sup>	Cambios aminoacídicos <sup>c</sup>							Antibióticos β-lactámicos evaluados <sup>d</sup>				
		V27A	Q38R	A77V	N106S	N114D	A140S	P167S	D240G	CTX	CAZ	FEP	CXM
CTX-M-10										256	1	32	≥256
	CTX-M-10.3			+						≥256	8	128	≥256
	CTX-M-10.4			+				+		4	64	1	64
	CTX-M-10.5			+					+	≥256	8	32	≥256
	CTX-M-10.6				+					2	0.5	1	≥256
	CTX-M-10.7				+			+		2	16	1	≥256
	CTX-M-10.8				+				+	64	2	4	≥256
	CTX-M-10.9							+	+	4	4	<0.25	≥256
		+	+							256	1	32	≥256
CTX-M-3	CTX-M-3.3	+	+	+						128	1	1.5	≥256
	CTX-M-3.4 (=CTX-M-54)	+	+	+				+	+	≥256	2	4	≥256
	CTX-M-3.5	+	+		+					3	0.5	1.5	≥256
	CTX-M-3.6	+	+		+			+		3	32	1.5	≥256
	CTX-M-3.7 (=CTX-M-33)	+	+		+				+	≥256	2	8	≥256
	CTX-M-3.8	+	+					+	+	1.5	8	0.5	≥256

<sup>a</sup> Variantes CTX-M identificadas en contextos naturales. <sup>b</sup> Mutantes CTX-M-1 obtenidos por mutagénesis dirigida. <sup>c</sup> Cambios aminoacídicos presentes en cada alelo CTX-M en comparación con CTX-M-10 se representan con “+”. <sup>d</sup> Valores de concentración mínima inhibitoria observados para cada antibiótico analizado identificados por E-test: CTX= cefotaxima; CAZ= ceftazidima; FEP= cefepima; CXM=cefuroxima.



# Capítulo 4

---

## DISCUSIÓN

“La verdadera filosofía es reaprender a ver el mundo.”

**Merleau-Ponty**

“Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas.”

**Ramón y Cajal.**





#### 4.1. Genética de poblaciones microbianas y cambio epidemiológico de las BLEE

La genética de poblaciones estudia la variación y la evolución genética de las poblaciones bajo la influencia de fuerzas evolutivas. Utilizamos aquí este término para expresar que la variación en frecuencia y en secuencia de los genes productores de BLEE está dependiendo de la selección natural de clones, de la dinámica de aparición de variantes, y del flujo genético horizontal. Los resultados de este estudio revelan una gran variación y diversidad de clones y elementos de transferencia horizontal asociados a genes que codifican BLEE de clase A de determinadas familias (TEM, SHV, CTX-M). Su distribución temporal refleja: i) un cambio epidemiológico caracterizado por el aumento de aislados de origen extrahospitalario, ii) la asociación a infecciones del tracto urinario y iii) la selección de distintas variantes BLEE. Este aumento simultáneo de la prevalencia y de la diversidad de BLEEs, ha sido observado en otros estudios epidemiológicos recientes en Europa, Asia y América, constatando la globalidad de este cambio (54, 68, 73, 187, 268, 477). Aunque algunos tipos específicos de enzimas se han diseminado globalmente como es el caso de TEM-24, CTX-M-15 o SHV-2, SHV-5 y SHV-12 (54, 94, 268, 300, 314, 338), otras enzimas permanecen confinadas a áreas geográficas específicas; así, TEM-4 es identificada solamente en España y Francia desde 1995, CTX-M-2 sólo es prevalente en Suramérica y Japón desde principios de los 90 y CTX-M-9 se encuentra descrita solamente en el sur de Europa desde 1996 (74, 95, 191, 385).

La relación clásica de enzimas de tipo TEM o SHV con las especies *K. pneumoniae* y *Enterobacter* spp. causantes de infecciones de origen nosocomial se asoció durante los años 1990 a factores de riesgo como el uso de cefalosporinas de tercera generación, inserción de dispositivos médicos invasivos y/o largos periodos de hospitalización (71, 404, 405). Esta imagen contrasta con la situación actual caracterizada por una mayor frecuencia de enzimas de tipo CTX-M en cepas de *E. coli* ampliamente diseminadas en el ámbito comunitario, y frecuentemente causantes de infecciones urinarias (74, 194, 315, 368, 501). En este escenario los factores más relevantes de riesgo se relacionan con el uso de fluoroquinolonas u otros grupos de antibióticos en enfermos ambulatorios crónicos o en residencias de la tercera edad (9, 337). Es posible que el aumento de BLEEs en la comunidad esté también influenciado por la selección antibiótica ejercida en animales (41, 76, 255, 291, 393). Sin embargo, la dispersión de los tipos de BLEE de más reciente aparición (CTX-M y algunas variantes de TEM y SHV), no ha conducido a un reemplazamiento de las enzimas inicialmente detectadas (TEM o SHV), lo cual parece indicar la existencia de condiciones para la persistencia de diferentes tipos de BLEE, probablemente implicando clones (ecotipos) y/o elementos genéticos transferibles de carácter endémico o epidémico (74, 472).

Los estudios realizados en esta tesis demuestran que el nuevo marco epidemiológico de los microorganismos productores de BLEEs, desbordando el compartimento hospitalario para introducirse en la microbiota intestinal normal, y por tanto en la infección de la comunidad, se ha debido a una **selección y expansión** reciente de distintos **clones y elementos genéticos de transmisión horizontal**.

#### 4.2. Caracterización de las unidades de captura génica y dispersión clonal

La diseminación de variantes específicas de BLEE parece haber sido facilitada por la dispersión de clones de distintas especies, como ilustran los ejemplos de TEM-24 (amplificada por la diseminación en distintos países de un único clon de *E. aerogenes*), CTX-M-15 (amplificadas por un clon epidémico de *E. coli*), y de TEM-4 y SHV-2 (amplificadas por clones de *K. pneumoniae*, no incluidas en esta Tesis).

Algunas poblaciones de *E. coli* se encuentran frecuentemente asociadas con hospedadores o hábitats específicos (83, 123, 192, 433, 479, este trabajo). La expansión de estas poblaciones en la naturaleza arrastra el conjunto de su contenido genético y de esta forma, la epidemiología de la resistencia (incluyendo BLEE) es altamente dependiente del éxito adaptativo de determinados clones. Así, encontramos expansiones significativas de poblaciones clonales en *E. coli* de los grupos filogenéticos B2 (ST131, ST29), D (ST69) o A (ST10), en contraste con la estructura aparentemente panmítica de la población del grupo filogenético B1 (www.mlst.net, este estudio, 37, 94, 209, 467). La selección y expansión de poblaciones clonales asociadas a determinados hospedadores ha sido también documentada en otros microorganismos Gram positivos como *Enterococcus faecium* (CC17 en individuos hospitalizados), *E. faecalis* (CC2, CC9, CC87 en individuos hospitalizados y ST16 en la comunidad) o *S. aureus* (CC5, CC8, CC22, CC30, CC45), y en bacterias no-fermentadoras como *P. aeruginosa* (ST244 y ST235) (96, 135, 137, 245, 287). El éxito adaptativo y la resultante selección clonal parecen estar influenciados por la adquisición de elementos genéticos de resistencia y/o virulencia (287, 401, 467).

A pesar de la selección clonal observada en algunos casos, el análisis de la población de aislados de origen humano de *E. coli* productores de BLEE de este estudio refleja una estabilidad de la frecuencia relativa de los distintos grupos filogenéticos denominada *composición genética óptima* (CGO) por Whittam y col y que ha sido documentada en poblaciones de *E. coli* sensibles y resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos de origen animal (436, 479) y humano (138, 397). La preservación de la CGO sugiere fuertemente que existe una elevada robustez (término acuñado en la biología de sistemas, que indica inercia ante la modificación externa) de los ecotipos de *E. coli*, probablemente relacionados con la adaptación a microhábitats específicos. Para mantener la CGO, la única solución evolutiva sería la amplia

distribución de los elementos genéticos implicados en la diseminación de genes *bla* de distintos tipos en poblaciones de *E. coli* de múltiples orígenes. La diseminación plasmídica de carácter adaptativo (confiriendo resistencia) serviría por tanto para la estabilización del sistema microbiano, cuyo equilibrio hubiese podido ser alterado como consecuencia de la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos dando lugar a una mayor representación numérica de determinados filogrupos (123, 168, 170, 211, 340, 433). Hay que tener en cuenta sin embargo que muchos de estos estudios se han realizado en poblaciones seleccionadas de *E. coli*, lo cual incluye sesgos asociados a factores como la edad, el sexo, o la zona geográfica, dificultando la interpretación global de la estructura poblacional en esta especie (6, 169, 170, 171, 340).

La estabilidad global de la CGO no impide obviamente que pueda observarse *sobrerrepresentación de algunos grupos filogenéticos* cuando consideramos tipos de enzimas específicas, que se corresponde con el origen de los aislados y los elementos genéticos que éstos contienen. Así, vemos que las variantes de BLEE asociadas a aislados de origen comunitario y ampliamente documentadas en animales, individuos sanos y medio ambiente, como SHV-12, TEM-52, CTX-M-9, CTX-M-14 o CTX-M-32 se encuentran mayoritariamente asociadas a los *E. coli* de los grupos filogenéticos A y B1. Sin embargo, las BLEEs que se identifican en pacientes hospitalizados como TEM-24, SHV-2, o CTX-M-15 están preferentemente asociadas con los filogrupos B2 o D. Estos resultados han sido recientemente confirmados en otros trabajos basados en poblaciones de *E. coli* productoras de BLEE que han relacionado la prevalencia de filogrupos específicos con la presencia de determinados genes *bla* o factores de virulencia (53, 211, 220, 366). Sin duda, la asociación de determinadas BLEE “clásicas” de tipo TEM o SHV con algunos ecotipos y de BLEE del tipo CTX-M a otros podría justificar la observación, a primera vista sorprendente, de la no-substitución de las antiguas por las nuevas BLEEs, que se comentaba con anterioridad.

La localización de genes *bla* de poblaciones heterogéneas de enterobacterias en plásmidos transferibles refleja el impacto de los procesos de *transferencia horizontal* en la diseminación de BLEE. Los genes *bla*<sub>BLEE</sub> analizados en esta tesis, así como los descritos en otros estudios recientes, han sido identificados mayoritariamente en *plásmidos conjugativos* pertenecientes a los grupos de incompatibilidad ya presentes en enterobacterias de la colección Murray (1917-1954) y/o en aislados de las décadas de los 50 y 60s, poco después de la introducción de los antibióticos (79, 99, 114, 202, 216, 324, 391). Esta observación sugiere que dichos plásmidos podrían haber co-evolucionado con sus huéspedes, asegurando la transmisión de información genética adaptativa en el sistema microbiano, con mínimas alteraciones del mismo frente a la perturbación (*transferencia genética horizontal equilibradora*).

Los análisis incluidos en esta tesis ilustran la asociación de algunos genes *bla* a plásmidos de determinados grupos de incompatibilidad como *bla*<sub>TEM-24</sub> a plásmidos IncA/C<sub>2</sub> de 180kb,

*bla*<sub>CTX-M-32</sub> a un plásmido IncN de 30kb, *bla*<sub>CTX-M-9</sub> a plásmidos IncHI2, o *bla*<sub>CTX-M-15</sub> a plásmidos IncFII. Dicha asociación parece reflejar el origen de los aislados y/o la relación con determinados hospedadores ya que los plásmidos de espectro restringido IncI1 se encuentran preferentemente en aislados de *E. coli* de los filogrupos A y B1 causantes de infecciones de origen comunitario (como los productores de CTX-M-14, SHV-12 o TEM-52 no incluidos en esta tesis), mientras que los plásmidos de tipo IncFII se identificaron en aislados clínicos de *E. coli* del filogrupo B2 productores de CTX-M-15. Por el contrario, los plásmidos asignados tradicionalmente de amplio espectro IncA/C o IncN fueron identificados en múltiples hospedadores (*Enterobacteriaceae* y no *Enterobacteriaceae*) y tanto en los compartimentos intra como extrahospitalario. Son muy escasos los estudios de ecología de plásmidos y limitados a muestras pequeñas y heterogéneas (79, 424). A pesar de la falta de datos disponibles acerca de la distribución de plásmidos en poblaciones de *E. coli*, algunos trabajos apuntan a una mayor prevalencia de plásmidos de la familia repFIIA (IncFII, IncI1, IncK, IncL/M) en aislados comensales y patógenos de humanos y aves y que podría haber dirigido la selección de algunos clones dentro de estas poblaciones (79, 216).

Como hemos señalado anteriormente, debe producirse un compromiso entre la estabilidad (probablemente de origen coevolutivo) de algunos tipos de plásmidos en determinados ecotipos bacterianos, y su función equilibradora del sistema múltiple de ecotipos, que requiere la transferencia y la diseminación a distintos huéspedes. De hecho, también observamos una gran heterogeneidad en la estructura genética de plásmidos pertenecientes a determinados grupos de incompatibilidad (IncFII, IncHI2, IncI1), reflejando una *diversificación plasmídica* debida a distintos procesos de recombinación favorecidos por la presencia de secuencias de inserción, transposones, integrones y otros “hot-spots” en algunos plásmidos conjugativos, y que podrían explicar las diferencias de tamaño, contenido de replicones, fenotipo de resistencia o transferibilidad observadas, pero también de sus diferencias en promiscuidad entre ecotipos (334, 335, 425).

El análisis del entorno genético de algunos genes *bla*<sub>BLEE</sub> (*bla*<sub>TEM-24</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y *bla*<sub>CTX-M-15</sub>) nos ha permitido comprobar su asociación con integrones de clase 1, y también con transposones particulares (TnI, Tn5393, Tn21), algunos de ellos presentes ya en los primeros plásmidos de resistencia descritos en la década de los 50s y globalmente diseminados en bacterias clínicas y medioambientales (113, 391). Una vez más, esto sugiere la pre-existencia en las poblaciones bacterianas de redes de intercambio genético con potenciales posibilidades adaptativas (quizá con función homeostática para el sistema microbiano). Simplemente, los genes de resistencia han parasitado estas redes de comunicación interbacteriana que ya existían con mucha anterioridad a la aparición de los antibióticos manufacturados por el hombre. De hecho, estas redes habían sido previamente parasitadas por mecanismos de protección contra

agentes selectivos pre-antibióticos. El análisis de los integrones y de los transposones que contienen determinantes de resistencia a mercurio, sugiere que son estas mismas estructuras las que podrían haber adquirido con posterioridad determinantes de resistencia a antibióticos. De hecho los genes de resistencia a mercurio que se encuentran en la actualidad en la vecindad genética de los genes de resistencia a antibióticos poseen, como se ha visto en este trabajo, una alta homología de estas secuencias con las de elementos análogos identificados hace décadas (identidad 99-100%). Estos determinantes se encuentran en plásmidos de distintos grupos de incompatibilidad, como en IncFII representado por R100 (1959), pC15-1a (1999) y pRSB107 (2005); en los plásmidos del grupo IncHI1 representado por pHCM1 (2001) e IncHI2 representado por R478 (2004); los del grupo IncP (pB10) o IncA/C<sub>2</sub> (pCC416) (números de acceso Genbank AP000342, 50, 89, 164, 342, 415, 449). Esta amplia distribución debe relacionarse probablemente con la capacidad de diseminación de transposones idénticos o muy relacionados con Tn21, que integran dichos operones que confieren resistencia a mercurio, y que también han sido parasitados más recientemente por determinantes de resistencia.

La diversificación plasmídica causada por fenómenos de recombinación homóloga puede ocurrir también entre diversos plásmidos del mismo o de distinto grupo de incompatibilidad, dando lugar a la formación de elementos mosaico o cointegrados (esta tesis, 51, 147, 213, 214, 242, 415, 425, 509). La observación frecuente de plásmidos que contienen simultáneamente replicones de elementos del mismo grupo de incompatibilidad han sido explicadas por Osborn y *col* que demostraron la relación entre variaciones en las secuencias *cop* y alteraciones de la compatibilidad, favoreciendo la formación de plásmidos con múltiples replicones o incluso pudiendo dirigir la evolución hacia nuevos grupos de incompatibilidad (223, 334). La selección de estos plásmidos de incompatibilidad híbrida podría deberse a la presión de mantenimiento en poblaciones bacterianas multiclonales. Por ejemplo, se han identificado plásmidos con replicones de los grupos IncI1 e IncFII, IncI1 e IncN o IncHI2 e IncFI, fenómeno que ha sido documentado en aislados clínicos (este estudio, 147, 470). Los plásmidos secuenciados de este tipo revelan el papel determinante de las secuencias de inserción en la generación de estos elementos (147).

Si la presión de selección se mantiene relativamente constante en una población bacteriana, y si la resistencia en dicha población (o microbiota) está ya suficientemente diseminada, podría producirse una selección de variantes resistentes que disminuyesen el coste biológico del mantenimiento de plásmidos, a través de un proceso de *selección periódica*. Una de las posibles soluciones es la captura de genes, integrones, transposones, e incluso plásmidos en el cromosoma bacteriano. Algunos autores han descrito un coste bajo o nulo asociado a la presencia de elementos genéticos como Tn1, o Tn3 o Tn10 (136, 250, 297). En esta tesis se presenta evidencia de captura cromosómica de genes *bla*<sub>ESBL</sub>, que implicaría integraciones

mediadas por *ISEcPI*, transposones, o plásmidos. Este evento había sido ocasionalmente descrito para genes BLEE de clase A (300, 504) pero es frecuente para los de clase B (151, 153, 273, 465, 466). La localización de genes, integrones o transposones en el cromosoma podría, incrementar la estabilidad de los mismos y también contribuir a la generación de variación genética en una población bacteriana (349, 429, 443).

El origen evolutivo de algunos grupos de BLEE ha sido identificado en  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de diferentes especies (*Kluyvera* spp. para CTX-M y *K. pneumoniae* para SHV), cuya captura y movilización a plásmidos parece haber ocurrido por efecto de secuencias de inserción (*ISEcPI*, *ISCR1*) o secuencias de fagos (74, 146, 329). La frecuente asociación de *ISEcPI* a distintos grupos de enzimas de tipo CTX-M sugiere una evolución a partir de un origen común. Sin embargo, la heterogeneidad existente entre las regiones entre *ISEcPI* y los distintos genes *bla*<sub>CTX-M</sub> analizados, y su asociación posterior a diferentes tipos de plataformas plasmídicas, indican una evolución divergente tras los primeros eventos de captura plasmídica de genes cromosómicos de *Kluyvera* spp. (esta tesis, 132, 302).

La transferencia plasmídica por conjugación tiene un fuerte impacto en la diseminación de la resistencia tanto en bacterias Gram negativas como en bacterias Gram positivas (31, 174, 264), habiéndose demostrado que los mismos plásmidos de resistencia pueden transmitirse entre bacterias del mismo o de distintos géneros, distribuidas entre muy diferentes nichos (clínico, animal, ambiente) (128, 235, 255, 331). Distintos trabajos han sugerido que la persistencia de algunos plásmidos en una población bacteriana, se encuentra influenciada por un equilibrio entre células portadoras y no portadores de plásmidos, favorecido por la conjugación (34, 124, 257) y por asociaciones específicas entre plásmido-hospedador que, incluso en ausencia de presión antibiótica, pueden constituir complejos estables con reducido coste biológico (111, 116, 125, 244). Reiteramos aquí el compromiso entre la estabilidad de algunos tipos de plásmidos en determinados hospedadores (ecotipos) y su función equilibradora de los conjuntos clonales y de los sistemas de la microbiota, que se produce mediante la transferencia horizontal (172).

La presencia de sistemas de mantenimiento específicos, toxina-antitoxina (TA) o restricción-modificación (RM) no ha sido analizada en los plásmidos estudiados en esta tesis, pero su amplia distribución en plásmidos de bacterias Gram negativas (188, 233), y su presencia en los diferentes plásmidos de enterobacterias secuenciados, algunos de ellos portadores de genes *bla*, permite inferir su contribución a la estabilización plasmídica (50, 106, 107, 167, 213, 449, 455, 509). Estos sistemas aseguran su mantenimiento en la célula huésped durante los procesos replicativos, pero también protegen la especificidad de la interacción genética plásmido-hospedador (93, 157, 188, 494). La distribución de los sistemas de mantenimiento es variable en función de los tipos de plásmidos, encontrándose frecuentemente los sistemas TA

*hok-sok*, *kis-kid* o *pemI-pemK* en plásmidos de tipo IncFII, *parDE* asociados a plásmidos de tipo IncP1- $\alpha$ , o el sistema RM mediado por la proteína *ardA* principalmente en plásmidos pertenecientes al complejo IncII o a los de tipo IncN (104, 108, 176, 218, 455, 509), sugiriendo que los distintos mecanismos de mantenimiento plasmídico han sido adquiridos y seleccionados durante la co-evolución con la célula hospedadora; de hecho, muchos de estos sistemas son homólogos a los descritos en los cromosomas bacterianos, donde podrían haberse originado (188, 494).

### 4.3. Diversificación de los genes *bla*<sub>BLEE</sub>

La exposición continuada a una gran diversidad de antibióticos  $\beta$ -lactámicos parece haber dirigido la diversificación de BLEE de los distintos grupos hacia enzimas con mayor eficiencia hidrolítica o con espectro de actividad aumentado (166, 353). En algunos casos se han documentado casos de evolución de genes *bla* hacia variantes más resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, como *bla*<sub>CTX-M-1</sub> y *bla*<sub>CTX-M-32</sub> descrita en esta tesis o *bla*<sub>CTX-M-3</sub> y *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (206).

El aumento del espectro de actividad frente a ceftazidima a partir de CTX-M-3, fue asociado previamente a la presencia de las mutaciones P167S/D240G (16, 80, 376, 445). El antagonismo pleiotrópico observado con la presencia del cambio P167S, reflejado en una reducción en la actividad frente a otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos simultánea a un aumento de los valores de CMI a ceftazidima, ha sido también descrito previamente y parece estar asociado a una inestabilidad en el *loop omega* (105, 230, 231, 378, 441). Por otro lado, los mutantes con D240G, aparentemente menos eficientes frente a ceftazidima que los que contienen el cambio P167S, parecen retener mejor la actividad frente a cefotaxima, lo cual podría justificar la mayor frecuencia de esta mutación y la diseminación de variantes BLEE que la contienen como CTX-M-15 y CTX-M-32. Además, la selección de aislados con este tipo de mutantes CTX-M, que también presentan mayor actividad hidrolítica frente a cefuroxima, podría estar relacionada con el uso de este antibiótico en la comunidad, donde la presencia de enzimas de tipo CTX-M es altamente frecuente (74). La incompatibilidad verificada entre las mutaciones principalmente implicadas en el aumento de la resistencia a ceftazidima (P167S y D240G) parece indicar dos vías independientes para adquirir un fenotipo de resistencia a este antibiótico por parte de aislados que poseen un enzima de tipo CTX-M-1, y probablemente en otros cluster, dado que no se ha descrito la presencia simultánea de estos dos cambios en otras familias (manuscrito en preparación).

Las mutaciones secundarias identificadas en este estudio, A77V y N106S, parecen tener un papel importante en la adquisición de un fenotipo de resistencia más equilibrado frente a distintos antibióticos  $\beta$ -lactámicos, especialmente cuando se encuentran asociadas a P167S o



D240G, respectivamente. Aunque no es evidente una relación entre el residuo 106 y cambios favorables en la estructura tridimensional de la proteína, la mutación en la posición 77 parece estar relacionada con una alteración del *loop omega* por proximidad a la posición 167 (119, 120). Este tipo de mutantes ha sido descrito en variantes naturales (CTX-M-33, CTX-M-52, CTX-M-53, o CTX-M-57), cuya selección positiva podría haber sido mediada por exposición a ambientes selectivos cambiantes utilizando cefotaxima, ceftazidima y/o cefepima, como se ha sugerido en trabajos basados en enzimas de tipo TEM (42).

Nuestros resultados indican que los aislados que producen CTX-M-10 podrían diversificarse hacia la resistencia a ceftazidima tanto o más que los que contienen CTX-M-3, dada la versatilidad de cambios que puede conferir resistencia a este antibiótico. Sin embargo, esta predicción no se ha confirmado en la Naturaleza, dado que las enzimas derivadas de CTX-M-3 son las que más lo han hecho. De hecho, algunas de sus variantes se encuentran altamente diseminadas, como CTX-M-15 o CTX-M-32 (56, 94, 337, este estudio). La introducción de las mutaciones que incrementan resistencia a ceftazidima no siempre da lugar a un fenotipo de alta resistencia, particularmente en las cepas de laboratorio (2 µg/ml), aunque no es infrecuente que las cepas clínicas con dichas mutaciones sean más resistentes, probablemente por tratarse de clones que incorporan otros mecanismos de resistencia como permeabilidad disminuída al antibiótico o debido a un aumento de expresión favorecido por la presencia de ISs. Sin embargo, a pesar de su escasa potencia para ser seleccionadas a través de la presión de selección por ceftazidima, las variantes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> o *bla*<sub>CTX-M-32</sub> podrían haberse diseminado con éxito al ser arrastrados por plataformas genéticas muy prevalentes y altamente transferibles (94, 320), lo cual revela la dificultad de hacer predicciones respecto a la evolución de la resistencia antibiótica (279).

Además de la diversificación de genes *bla* por mutación en sus secuencias, es interesante destacar la ***diversificación de contextos genéticos asociados a un mismo gen bla<sub>BLEE</sub>***. Se han detectado diferencias locales en la asociación de ciertas BLEE a entornos genéticos (CTX-M-10 asociada a secuencias de fagos en España o a *ISEcPI* en Francia, o CTX-M-32 asociada a IS5 e IS1 en distintas regiones de España, y/o plásmidos específicos, como CTX-M-3 en un plásmido IncL/M en aislados clínicos de Polonia, Francia o Bulgaria o de tipo IncHI2 en *K. pneumoniae* en Taiwan (107, 139, 156, 167, 239, 320, 329). Las diferentes asociaciones encontradas entre distintas BLEE a plásmidos de distintos grupos de incompatibilidad indican fenómenos de adquisición independientes, debidos a la disponibilidad de determinados tipos de plásmidos en nichos ecológicos específicos. Resaltamos aquí la importancia de la ecología local en la evolución de la resistencia (*local biology*).

En resumen, el rápido y espectacular aumento de enterobacterias productoras de BLEE que se ha producido en la última década en todo el mundo es debido a la diseminación global de

clones y elementos de transferencia horizontal, en su mayor parte ya detectados en aislamientos bacterianos muy cercanos, o incluso anteriores, a la introducción de los antibióticos en los años 50 y 60. El cambio observado en los factores de riesgo asociados a la transmisión de BLEE implica que deben establecerse nuevas estrategias de uso de antibióticos y medidas de vigilancia y control, para limitar los factores que pueden haber acelerado la diseminación de estas poblaciones resistentes. La asociación de los genes *bla*<sub>BLEE</sub> a plataformas genéticas modulares favorece los procesos de diversificación y transferencia horizontal, y también de coadaptación entre huésped y estructuras y vehículos genéticos, garantizando la persistencia y distribución equilibrada de genes de resistencia en las poblaciones microbianas complejas y en la microbiota de hombre y animales. La presión de selección del uso de antibióticos puede también haber contribuido a la selección de determinadas poblaciones o clones. El resultado de la actual diseminación y evolución de los genes *bla* parece responder a una combinación de la variación o deriva génica, generando variantes con mayor capacidad adaptativa, de la contribución de los elementos de transmisión horizontal en la dispersión de esas variantes entre las poblaciones bacterianas, y de la selección de clones con alta capacidad de transmisión o mantenimiento.



# Capítulo 5

---

## CONCLUSIONES

“La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real.  
Es un viaje, nunca una llegada.”

**Karl Popper**



Las conclusiones obtenidas del trabajo realizado en esta tesis son:

- Los estudios realizados en esta tesis demuestran que el hecho de que nos encontremos ante un nuevo marco epidemiológico de los microorganismos productores de BLEEs, desbordando el compartimento hospitalario para introducirse en la microbiota intestinal normal, y por tanto en la infección de la comunidad, se ha debido a una **selección y expansión** reciente de distintos **clones y elementos genéticos de transmisión horizontal** (plásmidos, transposones e integrones).
- **El análisis poblacional** de aislados de origen humano **de *E. coli* productores de BLEE** estudiados refleja una **composición genética óptima** (estabilidad de la frecuencia relativa de los distintos grupos filogenéticos) con una **sobre-representación local de algunos grupos filogenéticos** relacionada con la estructura epidémica de los aislados, su adaptación a hábitats particulares, y los tipos de enzimas específicas que contienen. La amplia distribución de cada uno de los elementos genéticos portadores de genes *bla* identificados en poblaciones de *E. coli* de múltiples orígenes contribuiría al mantenimiento de su **composición genética óptima**.
- La localización de los **genes *bla* en plásmidos conjugativos** pertenecientes a los grupos de incompatibilidad ya presentes en enterobacterias aisladas antes y poco después de la introducción de los antibióticos (1917-1954) y la asociación de algunos grupos de plásmidos con determinados ecotipos sugiere una **co-evolución de estos plásmidos con sus huéspedes**. La presencia de ISs, transposones, integrones y otras secuencias favorece la **evolución intra e inter-plasmídica** reflejada en la **diversificación** observada (variabilidad de tamaño, transferibilidad o fenotipo, formación de plásmidos mosaico o de plásmidos con múltiples replicones), que probablemente se ajusta, al menos parcialmente a la diversidad de las poblaciones bacterianas.
- La **asociación de los genes *bla* a integrones o transposones** localizados en islas genéticas modulares de los plásmidos conjugativos de enterobacterias indica la influencia de estos elementos en la actual diseminación de los genes de resistencia a antibióticos. El alto grado de identidad de las secuencias identificadas con las que pueden encontrarse en estructuras genéticas antiguas refleja la **evolución o selección reciente** de estas plataformas genéticas **en plásmidos de distintos grupos de incompatibilidad**.

- La **heterogeneidad** de las regiones intergénicas comprendidas entre *ISEcPI* y los distintos genes *bla*<sub>CTX-M</sub> y la asociación de esas unidades translocativas a distintos tipos de plásmidos conjugativos (*unidades de dispersión*) indica una **evolución divergente de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>** probablemente causada por **eventos de movilización y de diseminación independientes**.
- La **diversificación** de los genes *bla* hacia la generación de variantes con espectro de actividad aumentado frente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos parece también deberse a fenómenos **mutacionales**. Las *mutaciones* P167S y D240G parecen ser responsables del aumento significativo de la resistencia a ceftazidima mientras que la presencia de los cambios A77V y N106S parece influir en el equilibrio de los fenotipos de resistencia a distintos antibióticos  $\beta$ -lactámicos.
- El **antagonismo pleiotrópico** causado por la mutación P167S (confiere un aumento de resistencia a ceftazidima y la pérdida simultánea de actividad frente a otros antibióticos) y el fenotipo de resistencia más equilibrado observado en los mutantes CTX-M que presentan el cambio D240G, sugiere la existencia de **dos rutas evolutivas posibles en la aparición de variantes CTX-M resistentes a ceftazidima**.
- Los estudios de **genética multidimensional de poblaciones**, que considera poblaciones bacterianas, plasmídicas, de transposones, de integrones, y de genes, facilitan una visión integrada de los mecanismos evolutivos que permiten la **biología adaptativa de los microorganismos**.

# Capítulo 6

---

## BIBLIOGRAFÍA





1. **Abraham, E. P. y E. Chain.** 1988. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Nature*. **10(4)**:677-8.
2. **Ahmed, A. M., A. I. Hussein y T. Shimamoto.** 2007. *Proteus mirabilis* clinical isolate harbouring a new variant of *Salmonella* genomic island 1 containing the multiple antibiotic resistance region. *J. Antimicrob. Chemother.* **59(2)**:184-190.
3. **Alanis, A. J.** 2005. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res.* **36(6)**:697-705.
4. **Ambler, R. P.** 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **289(1036)**:321-31.
5. **Ambler, R. P., A. F. Coulson, J. M. Frere, J. M. Ghuyssen, B. Joris, M. Forsman, R. C. Levesque, G. Tiraby y S. G. Waley.** 1991. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J.* **276 (Pt 1)**:269-70.
6. **Anderson, M. A., J. E. Whitlock y V. J. Harwood.** 2006. Diversity and distribution of *Escherichia coli* genotypes and antibiotic resistance phenotypes in feces of humans, cattle, and horses. *Appl Environ Microbiol.* **72(11)**:6914-22.
7. **Antunes, P., J. Machado y L. Peixe.** 2006. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *J Antimicrob Chemother.* **58(2)**:297-304.
8. **Arduino, S. M., P. H. Roy, G. A. Jacoby, B. E. Orman, S. A. Pineiro y D. Centron.** 2002. *bla*<sub>CTX-M-2</sub> is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. *Antimicrob Agents Chemother.* **46(7)**:2303-6.
9. **Arpin, C., L. Coulange, V. Dubois, C. André, I. Fischer, S. Fourmaux, F. Grobost, J. Jullin, B. Dutilh, J. F. Couture, P. Noury, I. Lagrange, A. Ducastaing, H. P. Doermann y C. Quentin.** 2007. Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* strains in various types of private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother.* **51(9)**:3440-4.
10. **Arpin, C., V. Dubois, L. Coulange, C. André, I. Fischer, P. Noury, F. Grobost, J. P. Brochet, J. Jullin, B. Dutilh, G. Larribet, I. Lagrange y C. Quentin.** 2003. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in community and private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother.* **47(11)**:3506-14.
- 10a. **Asensio, A., A. Oliver, P. González-Diego, F. Baquero, J.C. Pérez-Díaz, P. Ros, J. Cobo, y M. Palacios, D. Lasheras, y R. Cantón.** 2000. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis.* **30(1)**:55-60.
11. **Athanasopoulos, V., J. Praszkie y A. J. Pittard.** 1995. The replication of an IncL/M plasmid is subject to antisense control. *J Bacteriol.* **177(16)**:4730-41.
12. **Aubert, D., T. Naas, C. Heritier, L. Poirel y P. Nordmann.** 2006. Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of beta-lactam resistance genes. *J Bacteriol.* **188(18)**:6506-14.
13. **Aumeran, C., C. Chanal, R. Labia, D. Sirot, J. Sirot y R. Bonnet.** 2003. Effects of Ser130Gly and Asp240Lys substitutions in extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-9. *Antimicrob Agents Chemother.* **47(9)**:2958-61.
14. **Avila, P., y F. de la Cruz.** 1988. Physical and genetic map of the IncW plasmid R388. *Plasmid.* **20(2)**:155-7.
15. **Bach, S., A. de Almeida y E. Carniel.** 2000. The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol Lett.* **183(2)**:289-94.
16. **Bae, I. K., B. H. Lee, H. Y. Hwang, S. H. Jeong, S. G. Hong, C. L. Chang, H. S. Kwak, H. J. Kim y H. Youn.** 2006. A novel ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase, CTX-M-54, with a single amino acid substitution at position 167 in the omega loop. *J Antimicrob Chemother.* **58(2)**:315-9.
17. **Bahl, M. I., L. H. Hansen, A. Goesmann y S. J. Sorensen.** 2007. The multiple antibiotic resistance IncP-1 plasmid pKJK5 isolated from a soil environment is phylogenetically divergent from members of the previously established alpha, beta and delta sub-groups. *Plasmid.* **58(1)**:31-43.
18. **Baraniak, A., J. Fiett, A. Mrówka, J. Walory, W. Hryniewicz y M. Gniadkowski.** 2005. Evolution of TEM-type extended-spectrum beta-lactamases in clinical *Enterobacteriaceae* strains in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* **49(5)**:1872-80.
19. **Baraniak, A., J. Fiett, A. Sulikowska, W. Hryniewicz y M. Gniadkowski.** 2002. Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase-producing microorganisms of the family *Enterobacteriaceae* in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* **46(1)**:151-9.
20. **Barbosa, T. M. y S. B. Levy.** 2000. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist Updat.* **3(5)**:303-311.
21. **Barlow, M. y B. G. Hall.** 2002. Predicting evolutionary potential: in vitro evolution

- accurately reproduces natural evolution of the tem beta-lactamase. *Genetics*. **160**(3):823-32. Erratum in: *Genetics*. **161**(3):1355.
22. **Barlow, M. Y B. G. Hall.** 2003. Experimental prediction of the natural evolution of antibiotic resistance. *Genetics*. **163**(4):1237-41.
- 22a. **Barlow, M., R.A. Reik, S.D. Jacobs, M. Medina, M.P. Meyer, J.E. Jr McGowan y F.C., Tenover.** 2008. High rate of mobilization for *bla*<sub>CTX-Ms</sub>. *Emerg Infect Dis*. **14**(3):423-8.
23. **Barroso H., A. Freitas-Vieira, L. M. Lito, J. M. Cristino, M. J. Salgado, H. F. Neto, J. C. Sousa, G. Soveral, T. Moura y A. Duarte.** 2000. Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases at a Portuguese hospital: TEM-10 as the endemic enzyme. *J Antimicrob Chemother*. **45**(5):611-6.
24. **Barton, B. M., G. P. Harding y A. J. Zuccarelli.** 1995. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal. Biochem*. **226**:235-40.
25. **Bauernfeind, A., H. Grimm, and S. Schweighart.** 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*. **18**:294-8.
26. **Bauernfeind, A., J. M. Casellas, M. Goldberg, M. Holley, R. Jungwirth, P. Mangold, T. Röhnisch, S. Schweighart, R. Wilhelm.** 1992. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection*. **20**(3):158-63.
27. **Beaber, J. W., B. Hochhut y M. K. Waldor.** 2002. Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*. **184**(15):4259-69.
28. **Beaber, J. W., V. Burrus, B. Hochhut y M. K. Waldor.** 2002. Comparison of SXT and R391, two conjugative integrating elements: definition of a genetic backbone for the mobilization of resistance determinants. *Cell Mol Life Sci*. **59**(12):2065-70.
29. **Ben-Hamouda, T., T. Foulon y K. Ben-Mahrez.** 2004. Involvement of SHV-12 and SHV-2a encoding plasmids in outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. *Microb Drug Resist*. **10**(2):132-8.
30. **Bennett, P. M.** 2004. Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement. *Methods Mol Biol*. **266**:71-113.
31. **Bennett, P. M.** 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol*. **153 Suppl 1**:S347-57. Review.
32. **Berg, D. E., M. M. Howe y editors.** 1989. In *Mobile DNA*. Washington (D.C.): ASM Press. 972
33. **Bergquist, P. L., S. Saadi y W. K. Maas.** 1986. Distribution of basic replicons having homology with RepFIA, RepFIB, and RepFIC among IncF group plasmids. *Plasmid*. **15**(1):19-34.
34. **Bergstrom, C. T., M. Lipsitch y B. R. Levin.** 2000. Natural selection, infectious transfer and the existence conditions for bacterial plasmids. *Genetics*. **155**(4):1505-19.
35. **Bert, F., C. Branger y N. Lambert-Zechovsky.** 2002. Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother*. **50**(1):11-8.
36. **Bethel, C. R., A. M. Hujer, K. M. Hujer, J. M. Thomson, M. W. Ruzsyczky, V. E. Anderson, M. Pusztai-Carey, M. Taracila, M. S. Helfand y R. A. Bonomo.** 2006. Role of Asp104 in the SHV beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. **50**(12):4124-31.
37. **Bidet, P., A. Metais, F. Mahjoub-Messai, L. Durand, M. Dehem, Y. Aujard, E. Bingen, X. Nassif y S. Bonacorsi.** 2007. Detection and identification by PCR of a highly virulent phylogenetic subgroup among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* B2 strains. *Appl Environ Microbiol*. **73**(7):2373-7.
38. **Biendo, M., D. Thomas, G. Laurans, F. Hamdad-Daoudi, B. Canarelli, F. Rousseau, S. Castelain y F. Eb.** 2005. Molecular diversity of *Proteus mirabilis* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases in a French university hospital. *Clin Microbiol Infect*. **11**(5):395-401.
39. **Bingen, E., B. Picard, N. Brahimi, S. Mathy, P. Desjardins, J. Elion y E. Denamur.** 1998. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J. Infect. Dis*. **177**:642-50.
40. **Birnboim, H. C. y J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. **7**(6):1513-23.
41. **Blanc, V, R. Mesa, M. Saco, S. Lavilla, G. Prats, E. Miró, F. Navarro, P. Cortés y M. Llagostera.** 2006. ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Vet Microbiol*. **118**(3-4):299-304.
42. **Blazquez, J., M. I. Morosini, M. C. Negri y F. Baquero.** 2000. Selection of naturally occurring extended-spectrum TEM beta-lactamase variants by fluctuating beta-lactam

- pressure. *Antimicrob Agents Chemother.* **44(8)**:2182-4.
43. **Bogdanova, E. S., I. A. Bass, L. S. Minakhin, M. A. Petrova, S. Z. Mindlin, A. A. Volodin, E. S. Kalyaeva, J. M. Tiedje, J. L. Hobman, N. L. Brown y V. G. Nikiforov.** 1998. Horizontal spread of *mer* operons among gram-positive bacteria in natural environments. *Microbiology.* **144 (Pt 3)**:609-20.
44. **Boltner, D., C. MacMahon, J. T. Pembroke, P. Strike y A. M. Osborn.** 2002. R391: a conjugative integrating mosaic comprised of phage, plasmid, and transposon elements. *J Bacteriol.* **184(18)**:5158-69.
45. **Bonnet, R.** 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1-14.
46. **Bonnet, R., J. L. Sampaio, C. Chanal, D. Sirot, C. de Champs, J. L. Viallard, R. Labia y J. Sirot.** 2000. A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**:3061-8.
47. **Bonnet, R., J.L. Sampaio, R. Labia, C. De Champs, D. Sirot, C. Chanal y J. Sirot.** 2000. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**:1936-42.
48. **Bosi, C., A. Davin-Regli, C. Bornet, M. Mallea, J. M. Pages y C. Bollet.** 1999. Most *Enterobacter aerogenes* strains in France belong to a prevalent clone. *J Clin Microbiol.* **37(7)**:2165-9.
49. **Bouza, E. y E. Cercenado.** 2002. *Klebsiella* and *enterobacter*: antibiotic resistance and treatment implications. *Semin Respir Infect.* **17(3)**:215-30.
50. **Boyd, D. A., S. Tyler, S. Christianson, A. McGeer, M. P. Muller, B. M. Willey, E. Bryce, M. Gardam, P. Nordmann y M. R. Mulvey.** 2004. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* **48(10)**:3758-64.
51. **Boyd, E. F., C. W. Hill, S. M. Rich y D. L. Hartl.** 1996. Mosaic structure of plasmids from natural populations of *Escherichia coli*. *Genetics.* **143(3)**:1091-100.
52. **Bradford, P. A.** 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* **14(4)**:933-51, table of contents. Review.
53. **Branger, C., O. Zamfir, S. Geoffroy, G. Laurans, G. Arlet, H.V. Thien, S. Gouriou, B. Picard y E. Denamur.** 2005. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerg Infect Dis.* **11(1)**:54-61.
54. **Brasme, L., P. Nordmann, F. Fidel, M.F. Lartigue, O. Bajolet, L. Poiriel, D. Forte, V. Vernet-Garnier, J. Madoux, J.C. Reveil, C. Alba-Sauviat, I. Baudinat, P. Bineau, C. Bouquigny-Saison, C. Eloy, C. Lafaurie, D. Siméon, J.P. Verquin, F. Noël, C. Strady y C. De Champs.** 2007. Incidence of class A extended-spectrum beta-lactamases in Champagne-Ardenne (France): a 1 year prospective study. *J Antimicrob Chemother.* **60(5)**:956-64. Erratum in: *J Antimicrob Chemother.* 2008 Jan;61(1):231-2.
55. **Brendler, T., L. Reaves y S. Austin.** 2004. Interplay between plasmid partition and postsegregational killing systems. *J Bacteriol.* **186(8)**:2504-7.
56. **Briñas, L., M. A. Moreno, T. Teshager, Y. Saenz, M. C. Porrero, L. Dominguez y C. Torres.** 2005. Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* **49(3)**:1262-4.
57. **Briñas, L., M. Lantero, M. Zarazaga, F. Perez y C. Torres.** 2004. Outbreak of SHV-5 beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal-pediatric intensive care unit in Spain. *Microb Drug Resist.* **10(4)**:354-8.
58. **Brisse, S., T. van Himbergen, K. Kusters, y J. Verhoef.** 2004. Development of a rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. *Clin Microbiol Infect.* **10(10)**:942-5.
59. **Brisse, S. y E. Duijkeren.** 2005. Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. *Vet Microbiol.* **105(3-4)**:307-12.
60. **Brown, A. M. y N. S. Willetts.** 1981. A physical and genetic map of the IncN plasmid R46. *Plasmid.* **5(2)**:188-201.
61. **Brown, H. J., H. W. Stokes y R. M. Hall.** 1996. The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives. *J Bacteriol.* **178(15)**:4429-37.
62. **Buchrieser, C., M. Prentice y E. Carniel.** 1998. The 102-kilobase unstable region of *Yersinia pestis* comprises a high-pathogenicity island linked to a pigmentation segment which undergoes internal rearrangement. *J. Bacteriol.* **180**:2321-2329.
63. **Burrus, V. y M. K. Waldor.** 2004. Formation of SXT tandem arrays and SXT-R391 hybrids. *J Bacteriol.* **186(9)**:2636-45.
64. **Burrus, V. y M. K. Waldor.** 2004. Shaping bacterial genomes with integrative and

- conjugative elements. *Res Microbiol.* **155(5)**:376-86. Review.
65. **Burrus, V., G. Pavlovic, B. Decaris y G. Guedon.** 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol.* **46(3)**:601-10. Review
66. **Burrus, V., J. Marrero y M. K. Waldor.** 2006. The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. *Plasmid.* **55(3)**:173-83. Review.
67. **Bush, K.** 2001. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.* **32(7)**:1085-9. Review.
68. **Bush, K.** 2008. Extended-spectrum beta-lactamases in North America, 1987-2006. *Clin Microbiol Infect.* **1**:134-43. Review.
69. **Bush, K., G. A. Jacoby y A. A. Medeiros.** 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* **39(6)**:1211-33. Review.
70. **Cai, J. C., H. W. Zhou, R. Zhang y G. X. Chen.** 2008. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing {beta}-lactamase KPC-2 in intensive care units from a Chinese hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Mar 10. [Epub ahead of print]
71. **Calbo, E., V. Romani, M. Xercavins, L. Gómez, C.G. Vidal, S. Quintana, J. Vila y J. Garau.** 2006. Risk factors for community-onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* **57(4)**:780-3.
72. **Cantón, R., A. Oliver, T. M. Coque, M. del C. Varela, J. C. Pérez-Díaz y F. Baquero.** 2002. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol.* **40(4)**:1237-43.
73. **Cantón, R., A. Novais, A. Valverde, E. Machado, L. Peixe, F. Baquero y T. M. Coque.** 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* **1**:144-53. Review.
- 73a. **Cantón, R., M.I. Morosini, O.M. de la Maza, y E.G. de la Pedrosa.** 2008. IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance. *Clin Microbiol Infect.* **14 Suppl 1**:53-62. Review. Erratum in: *Clin Microbiol Infect.* 2008 Mar;14(3):293. Martín, O [removed]; de la Maza, S[corrected to de la Maza, O Martín S].
74. **Cantón, R., y T. M. Coque.** 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:466-475.
75. **Cao, V., T. Lambert y P. Courvalin.** 2002. ColE1-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-17. *Antimicrob Agents Chemother.* **46(5)**:1212-7.
76. **Carattoli, A.** 2008. Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin Microbiol Infect.* **1**:117-23. Review.
77. **Carattoli, A., A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K. L. Hopkins y E. J. Threlfall.** 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* **63(3)**:219-28.
78. **Carattoli, A., L. Villa, C. Pezzella, E. Bordin y P. Visca.** 2001. Expanding drug resistance through integron acquisition by IncFI plasmids of *Salmonella enterica* Typhimurium. *Emerg Infect Dis.* **7(3)**:444-7.
79. **Carattoli, A., V. Miriagou, A. Bertini, A. Loli, C. Colinon, L. Villa, J. M. Whichard y G. Rossolini.** 2006. Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams. *Emerg Infect Dis.* **12(7)**:1145-8.
80. **Cartelle, M., M. del Mar Tomas, F. Molina, R. Moure, R. Villanueva y G. Bou.** 2004. High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution. *Antimicrob Agents Chemother.* **48(6)**:2308-13.
81. **Castanheira, M., H. S. Sader, L. M. Deshpande, T. R. Fritsche y R. N. Jones.** 2008. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother.* **52(2)**:570-3.
82. **Caugant, D. A., B. R. Levin y R. K. Selander.** 1981. Genetic diversity and temporal variation in the *E. coli* population of a human host. *Genetics.* **98(3)**:467-90.
83. **Clermont, O., M. Lescat, C. L. O'Brien, D. M. Gordon, O. Tenailon y E. Denamur.** 2008. Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. *Environ Microbiol.* **10**:1000-6.
84. **Clermont, O., S. Bonacorsi y E. Bingen.** 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66(10)**:4555-8.
85. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2006. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow Aerobically; Approved Standard. Seventh Edition Document M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA.

86. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2006. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Ninth Edition. Document M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA.
87. **Cloekaert, A., K. Praud, B. Doublet, A. Bertini, A. Carattoli, P. Butaye, H. Imberechts, S. Bertrand, J. M. Collard, G. Arlet y F. X. Weill.** 2007. Dissemination of an extended-spectrum-beta-lactamase *bla*<sub>TEM-52</sub> gene-carrying Inc11 plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France between 2001 and 2005. *Antimicrob Agents Chemother.* **51(5)**:1872-5.
88. **Cohan, F. M.** 2001. Bacterial species and speciation. *Syst Biol.* **50(4)**:513-24. Review.
89. **Colinon, C., V. Miriagou, A. Carattoli, F. Luzzaro y G. M. Rossolini.** 2007. Characterization of the IncA/C plasmid pCC416 encoding VIM-4 and CMY-4 beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* **60(2)**:258-62.
90. **Colonna, B., M. Bernardini, G. Micheli, F. Maimone, M. Nicoletti y M. Casalino.** 1988. The *Salmonella* wien virulence plasmid pZM3 carries Tn1935, a multiresistance transposon containing a composite IS1936-kanamycin resistance element. *Plasmid.* **20(3)**:221-31.
91. **Collis, C. M., M. J. Kim, S. R. Partridge, H. W. Stokes y R. M. Hall.** 2002. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J Bacteriol.* **184(11)**:3017-26.
92. **Condon, C. y J. H. Weiner.** 1988. Fumarate reductase of *Escherichia coli*: an investigation of function and assembly using in vivo complementation. *Mol Microbiol.* **2(1)**:43-52.
93. **Cooper, T. F. y J. A. Heinemann.** 2000. Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97(23)**:12643-8.
94. **Coque, T. M., A. Novais, A. Carattoli, L. Poirel, J. Pitout, L. Peixe, F. Baquero, R. Cantón y P. Nordmann.** 2008. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis.* **14(2)**:195-200.
95. **Coque, T. M., A. Oliver, J. C. Pérez-Díaz, F. Baquero y R. Cantón.** 2002. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother.* **46(2)**:500-10.
96. **Coque, T. M.** 2008. Evolutionary biology of pathogenic enterococci. In F. Baquero, C. Nombela, G. H. Casell, and J. A. Gutierrez (ed.), *Introduction to evolutionary biology of bacterial and fungal pathogens.* ASM Press, Washington, DC.
97. **Cornaglia, G., A. Mazzariol, L. Lauretti, G.M. Rossolini y R. Fontana.** 2000. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. *Clin Infect Dis.* **31**:1119-25.
98. **Correia, M., F. Boavida, F. Grosso, M. J. Salgado, L. M. Lito, J. M. Cristino, S. Mendo y A. Duarte.** 2003. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **47(9)**:2838-43.
99. **Couturier, M., F. Bex, P. L. Bergquist y W. K. Maas.** 1988. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev.* **52(3)**:375-95. Review.
100. **Cuzon, G., T. Naas, M.C. Demachy y P. Nordmann.** 2008. B Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. *Antimicrob Agents Chemother.* **52(2)**:796-7.
101. **Chaibi, E. B., D. Sirot, G. Paul y R. Labia.** 1999. Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J Antimicrob Chemother.* **43(4)**:447-58. Review.
102. **Chanawong, A., F. H. M'Zali, J. Heritage, A. Lulitanond y P. M. Hawkey.** 2001. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother.* **48(6)**:839-52.
103. **Chaves, J., M. G. Ladona, C. Segura, A. Coira, R. Reig y C. Ampurdanes.** 2001. SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **45(10)**:2856-61.
104. **Chen, C. Y., G. W. Nace, B. Solow y P. Fratamico.** 2007. Complete nucleotide sequences of 84.5- and 3.2-kb plasmids in the multi-antibiotic resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium U302 strain G8430. *Plasmid.* **57(1)**:29-43.
105. **Chen, Y., J. Delmas, J. Sirot, B. Shoichet y R. Bonnet.** 2005. Atomic resolution structures of CTX-M beta-lactamases: extended spectrum activities from increased mobility and decreased stability. *J Mol Biol.* **348(2)**:349-362.
106. **Chen, Y. T., H. Y. Shu, L. H. Li, T. L. Liao, K. M. Wu, Y. R. Shiau, J. J. Yan, I. J. Su, S. F. Tsai y T. L. Lauderdale.** 2006. Complete nucleotide sequence of pK245, a 98-kilobase plasmid conferring quinolone resistance and extended-spectrum-beta-lactamase activity in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate.

- Antimicrob Agents Chemother. **50(11)**:3861-6.
107. **Chen, Y. T., T. L. Lauderdale, T. L. Liao, Y. R. Shiau, H. Y. Shu, K. M. Wu, J. J. Yan, I. J. Su y S. F. Tsai.** 2007. Sequencing and comparative genomic analysis of pK29, a 269-kilobase conjugative plasmid encoding CMY-8 and CTX-M-3 beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. **51(8)**:3004-7.
108. **Chilley, P. M. y B. M. Wilkins.** 1995. Distribution of the *ardA* family of antirestriction genes on conjugative plasmids. Microbiology. **141 (Pt 9)**:2157-64.
109. **Chouchani, C., R. Berlemont, A. Masmoudi, M. Galleni, J.M. Frere, O. Belhad y K. Ben-Mahrez.** 2006. A novel extended-spectrum TEM-type beta-lactamase, TEM-138, from *Salmonella enterica* serovar Infantis. Antimicrob Agents Chemother. **50(9)**:3183-5.
- 109a. **Clermont O., M. Lescat, C.L. O'Brien , D.M. Gordon, O. Tenaillon, E. Denamur.** 2008. Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. Environ Microbiol ;**10(4)**:1000-6.
110. **Dagert, M. y S. D. Ehrlich.** 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. Gene. **6(1)**:23-8.
111. **Dahlberg, C. y L. Chao.** 2003. Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in *Escherichia coli* K12. Genetics. **165(4)**:1641-9.
112. **Danel, F., L. M. Hall y D. M. Livermore.** 1999. Laboratory mutants of OXA-10 beta-lactamase giving ceftazidime resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. **43(3)**:339-344.
113. **Datta, N. y R. W. Hedges.** 1972. R factors identified in Paris, some conferring gentamicin resistance, constitute a new compatibility group. Ann Inst Pasteur (Paris). **123(6)**:849-52.
114. **Datta, N. y V. M. Hughes.** 1983. Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. Nature. **306(5943)**:616-7.
115. **De Champs, C., C. Chanal, D. Sirot, R. Baraduc, J. P. Romaszko, R. Bonnet, A. Plaidy, M. Boyer, E. Carroy, M. C. Gbadamassi, S. Lалуque, O. Oules, M. C. Poupert, M. Villemain y J. Sirot.** 2004. Frequency and diversity of Class A extended-spectrum beta-lactamases in hospitals of the Auvergne, France: a 2 year prospective study. J Antimicrob Chemother. **54(3)**:634-9.
116. **De Gelder, L., J. M. Ponciano, P. Joyce y E. M. Top.** 2007. Stability of a promiscuous plasmid in different hosts: no guarantee for a long-term relationship. Microbiology. **153**:452-63.
117. **De Gheldre, Y., M. J. Struelens, Y. Glupczynski, P. De Mol, N. Maes, C. Nonhoff, H. Chetoui, C. Sion, O. Ronveaux, M. Vanechoutte; Groupement pour le Depistage, l'Etude et la Prevention des Infections Hospitalieres (GDEPIH-GOSPIZ).** 2001. National epidemiologic surveys of *Enterobacter aerogenes* in Belgian hospitals from 1996 to 1998. J Clin Microbiol. **39(3)**:889-96.
118. **Decousser, J. W., L. Poirel y P. Nordmann.** 2001. Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A  $\beta$ -lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. Antimicrob. Agents Chemother. **45(12)**:3595-3598.
119. **Delmas, J., F. Robin, F. Carvalho, C. Mongaret y R. Bonnet.** 2006. Prediction of the evolution of ceftazidime resistance in extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-9. Antimicrob Agents Chemother. **50(2)**:731-8.
120. **Delmas, J., Y. Chen, F. Prati, F. Robin, B. K. Shoichet y R. Bonnet.** 2008. Structure and dynamics of CTX-M enzymes reveal insights into substrate accommodation by extended-spectrum beta-lactamases. J. Mol. Biol. **375(1)**:192-201.
121. **Depardieu, F., I. Podglajen, R. Leclercq, E. Collatz y P. Courvalin.** 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. Clin Microbiol Rev. **20(1)**:79-114.
122. **Diancourt, L., V. Passet, J. Verhoef, P.A. Grimont y S. Brisse.** 2005. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. J Clin Microbiol. **43(8)**:4178-82.
123. **Diarra, M. S., F. G. Silversides, F. Diarrassouba, J. Pritchard, L. Masson, R. Brousseau, C. Bonnet, P. Delaquis, S. Bach, B. J. Skura y E. Topp.** 2007. Impact of feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and enterococcus counts, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* isolates. Appl Environ Microbiol. **73(20)**:6566-76.
124. **Dionisio, F., I. Matic, M. Radman, O. R. Rodrigues y F. Taddei.** 2002. Plasmids spread very fast in heterogeneous bacterial communities. Genetics. **162(4)**:1525-32.
125. **Dionisio, F., I.C. Conceicao, A.C. Marques, L. Fernandes y I. Gordo.** 2005. The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness. Biol Lett. **1(2)**:250-2.
126. **Doi, Y., y Y. Arakawa.** 2007. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. Clin Infect Dis. **45(1)**:88-94.

127. Doublet, B., D. Boyd, M.R. Mulvey y A. Cloeckart. 2005. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Mol Microbiol.* **55**(6):1911-24.
128. Doucet-Populaire, F., P. Trieu-Cuot, A. Andremont y P. Courvalin. 1992. Conjugal transfer of plasmid DNA from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli* in digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrob Agents Chemother.* **36**(2):502-4.
129. Dubois, V., C. Arpin, P. Noury, C. Andre, L. Coulangue y C. Quentin. 2005. Prolonged outbreak of infection due to TEM-21-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and enterobacteria in a nursing home. *J Clin Microbiol.* **43**(8):4129-38.
130. Dumarche, P., C. De Champs, D. Sirot, C. Chanal, R. Bonnet y J. Sirot. 2002. TEM derivative-producing *Enterobacter aerogenes* strains: dissemination of a prevalent clone. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**(4):1128-31.
131. Duriez, P., O. Clermont, S. Bonacorsi, E. Bingen, A. Chaventre, J. Elion, B. Picard y E. Denamur. 2001. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology.* **147**(Pt 6):1671-6.
132. Eckert, C., V. Gautiery y G. Arlet. 2006. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. *J Antimicrob Chemother.* **57**(1):14-23.
133. Ellington, M. J., D. M. Livermore, T. L. Pitt, L. M. Hall y N. Woodford. 2006. Development of extended-spectrum activity in TEM beta-lactamases in hyper-mutable, mutS *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect.* **12**(8):800-3.
134. Empel, J., A. Baraniak, E. Literacka, A. Mrówka, J. Fiett, E. Sadowy, W. Hryniewicz y M. Gniadkowski. 2008. The Beta-PL Study Group. Molecular survey of {beta}-lactamases conferring resistance to newer generation {beta}-lactams in *Enterobacteriaceae* in Polish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 May 5. [Epub ahead of print]
135. Empel, J., K. Filczak, A. Mrowka, W. Hryniewicz, D. M. Livermore y M. Gniadkowski. 2007. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum {beta}-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J Clin Microbiol.* **45**(9): 2829-34.
136. Enne, V. I., A. A. Delsol, G. R. Davis, S. L. Hayward, J. M. Roe y P. M. Bennett. 2005. Assessment of the fitness impacts on *Escherichia coli* of acquisition of antibiotic resistance genes encoded by different types of genetic element. *J Antimicrob Chemother.* **56**(3):544-51.
137. Enright, M. C., D. A. Robinson, G. Randle, E. J. Feil, H. Grundmann, y B. G. Spratt. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**(11):7687-92.
138. Escobar-Paramo, P., K. Grenet, A. Le Menac'h, L. Rode, E. Salgado, C. Amorin, S. Gouriou, B. Picard, M. C. Rahimy, A. Andremont, E. Denamur y R. Ruimy. 2004. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol.* **70**(9):5698-700.
- 138a. Escobar-Páramo P, A. Le Menac'h, T. Le Gall, C. Amorin, S. Gouriou, B. Picard, D. Skurnik, E. Denamur. 2006. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ Microbiol.* **8**(11):1975-84.
139. Fernandez, A., E. Gil, M. Cartelle, A. Perez, A. Beceiro, S. Mallo, M. M. Tomas, F. J. Perez-Llarena, R. Villanueva y G. Bou. 2007. Interspecies spread of CTX-M-32 extended-spectrum {beta}-lactamase and the role of the insertion sequence IS1 in down-regulating *bla*<sub>CTX-M</sub> gene expression. *J Antimicrob Chemother.* **59**(5):841-7.
140. Fiett, J., A. Palucha, B. Miaczynska, M. Stankiewicz, H. Przondo-Mordarska, W. Hryniewicz y M. Gniadkowski. 2000. A novel complex mutant beta-lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiellae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**(6):1499-505.
141. Fluit, A. C. y F. J. Schmitz. 1999. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **18**(11):761-70. Review.
142. Fluit, A. C. y F. J. Schmitz. 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect.* **10**(4):272-88. Review.
143. Fluit, A. C., A. Florijn, J. Verhoef y D. Milatovic. 2005. Susceptibility of European  $\beta$ -lactamase-positive and -negative *Haemophilus influenzae* isolates from the periods 1997/1998 and 2002/2003. *J Antimicrob Chemother.* **56**(1):133-8.
144. Ford, P. J. y M. B. Avison. 2004. Evolutionary mapping of the SHV beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent *bla*<sub>SHV</sub> mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J Antimicrob Chemother.* **54**(1):69-75.
145. Foster, G. C., G. C. McGhee, A. L. Jones y G. W. Sundin. 2004. Nucleotide sequences, genetic organization, and distribution of pEU30 and pEL60 from *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol.* **70**(12):7539-44.
146. Francia, M. V., A. Varsaki, M. P. Garcillan-Barcia, A. Latorre, C. Drainas y F. de la



- Cruz. 2004. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev.* **28(1)**:79-100. Review.
147. Froehlich, B., J. Parkhill, M. Sanders, M. A. Quail y J. R. Scott. 2005. The pCoo plasmid of enterotoxigenic *Escherichia coli* is a mosaic cointegrate. *J Bacteriol.* **187(18)**:6509-16.
148. Frost, L. S., R. Leplae, A. O. Summers y A. Toussaint. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol.* **3(9)**:722-32.
149. Furuya, E. Y. y F. D. Lowy. 2006. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol.* **4(1)**:36-45. Review.
150. Galán, J. C., M. I. Morosini, M. R. Baquero, M. Reig y F. Baquero. 2003. *Haemophilus influenzae* bla(ROB-1) mutations in hypermutagenic deltaampC *Escherichia coli* conferring resistance to cefotaxime and beta-lactamase inhibitors and increased susceptibility to cefaclor. *Antimicrob Agents Chemother.* **47(8)**:2551-7.
151. Galani, I., M. Souli, E. Koratzanis, Z. Chrysosouli y H. Giamarellou. 2006. Molecular characterization of an *Escherichia coli* clinical isolate that produces both metallo-beta-lactamase VIM-2 and extended-spectrum beta-lactamase GES-7: identification of the In8 integron carrying the bla<sub>VIM-2</sub> gene. *J Antimicrob Chemother.* **58(2)**:432-3.
152. Galani, I., M. Souli, Z. Chrysosouli y H. Giamarellou. 2007. Detection of CTX-M-15 and CTX-M-33, a novel variant of CTX-M-15, in clinical *Escherichia coli* isolates in Greece. *Int J Antimicrob Agents.* **29(5)**:598-600.
153. Galani, I., M. Souli, Z. Chrysosouli, K. Orlandou y H. Giamarellou. 2005. Characterization of a new integron containing bla(VIM-1) and aac(6')-IIc in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from Greece. *J Antimicrob Chemother.* **55(5)**:634-8.
154. Galdbart J. O., F. Lemann, D. Ainouz, P. Feron, N. Lambert-Zechovsky y C. Branger. 2000. TEM-24 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter aerogenes*: long-term clonal dissemination in French hospitals. *Clin Microbiol Infect.* **6(6)**:316-23.
155. Galimand, M., P. Courvalin y T. Lambert. 2003. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother.* **47(8)**:2565-71.
156. Galimand, M., S. Sabtcheva, P. Courvalin y T. Lambert. 2005. Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother.* **49(7)**:2949-53.
157. Garcillán-Barcia, M. P. y F. de la Cruz. 2008. Why is entry exclusion an essential feature of conjugative plasmids? *Plasmid*. [Epub ahead of print]
158. Garcillán-Barcia, M. P., I. Bernales, M. V. Mendiola y F. de la Cruz. 2006. IS91-rolling circle transposition. In: *Mobile DNA II*. Craig NL, Craigie R, Gellert M, Lambiowitz AM(eds). American Society for Microbiology, Washington, DC.
159. Gautom, R. K. 1997. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol.* **35(11)**:2977-80.
160. Gaynes, R. y J. R. Edwards. 2005. National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis.* **41(6)**:848-54.
161. Gebreyes, W. A. y S. Thakur. 2005. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Muenchen from pigs and humans and potential interserovar transfer of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**:503-11.
162. Gestal, A. M., H. W. Stokes, S. R. Partridge y R. M. Hall. 2005. Recombination between the dfrA12-orfF-aadA2 cassette array and an aadA1 gene cassette creates a hybrid cassette, aadA8b. *Antimicrob Agents Chemother.* **49(11)**:4771-4.
163. Giakkoupi, P., L. S. Tzouveleakis, A. Tsakris, V. Loukova, D. Sofianou y E. Tzelepi. 2000. IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother.* **44(9)**:2247-53.
164. Gilmour, M. W., N. R. Thomson, M. Sanders, J. Parkhill y D. E. Taylor. 2004. The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. *Plasmid.* **52(3)**:182-202.
165. Giraud-Morin C. y T. Fosse. 2003. A seven-year survey of *Klebsiella pneumoniae* producing TEM-24 extended-spectrum beta-lactamase in Nice University Hospital (1994-2000). *J Hosp Infect.* **54(1)**:25-31.
166. Gniadkowski, M. 2008. Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. *Clin Microbiol Infect.* **1**:11-32. Review.
167. Golebiewski, M., I. Kern-Zdanowicz, M. Zienkiewicz, M. Adamczyk, J. Zylinska, A. Baraniak, M. Gniadkowski, J. Bardowski y P. Ceglowski. 2007. Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its

- p>involvement in spread of the extended-spectrum beta-lactamase gene
- bla*
- <sub>CTX-M-3</sub>
- . Antimicrob Agents Chemother.
- 51(11)**
- :3789-95.
168. **Gordon, D. M. y A. Cowling.** 2003. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. Microbiology. **149(Pt 12)**:3575-86.
  169. **Gordon, D. M. y F. FitzGibbon.** 1999. The distribution of enteric bacteria from Australian mammals: host and geographical effects. Microbiology. **145 (Pt 10)**:2663-71.
  170. **Gordon, D. M., S. Bauer y J. R. Johnson.** 2002. The genetic structure of *Escherichia coli* populations in primary and secondary habitats. Microbiology. **148(Pt 5)**:1513-22.
  171. **Gordon, D. M., S. E. Stern y P. J. Collignon.** 2005. Influence of the age and sex of human hosts on the distribution of *Escherichia coli* ECOR groups and virulence traits. Microbiology. **151(Pt 1)**:15-23.
  172. **Gregory, R., J. R. Saunders y V. A. Saunders.** 2008. Rule-based computing system for microbial interactions and communications: evolution in virtual bacterial populations. J Immunol Methods. **332(1-2)**:18-30.
  173. **Grindley, N. D. F, N. Craig, R. Craigie, M. Gellert, y A.M. Lambowitz.** 2001. The movement of Tn3-like elements: Transposition and cointegrate resolution. In: Mobile DNA II. ASM Press, Washington D.C.
  174. **Grohmann, E., G. Muth y M. Espinosa.** 2003. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. **67(2)**:277-301, table of contents. Review.
  175. **Gu, B., M. Tong, W. Zhao, G. Liu, M. Ning, S. Pan y W. Zhao.** 2007. Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. J Clin Microbiol. **45(1)**:241-3.
  176. **Gulyaev, A. P., T. Franch y K. Gerdes.** 1997. Programmed cell death by hok/sok of plasmid R1: coupled nucleotide covariations reveal a phylogenetically conserved folding pathway in the hok family of mRNAs. J Mol Biol. **273(1)**:26-37.
  177. **Haeggman S., S. Lofdahl, A. Paauw, J. Verhoef y S. Brisse.** 2004. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. **48(7)**:2400-8.
  178. **Haines, A.S., K. Jones, S. M. Batt, I. A. Kosheleva y C. M. Thomas.** 2007. Sequence of plasmid pBS228 and reconstruction of the IncP-1alpha phylogeny. Plasmid. **58(1)**:76-83.
  179. **Haines, A. S., P. Akhtar, E. R. Stephens, K. Jones, C. M. Thomas, C. D. Perkins, J. R. Williams, M.J . Day y J. C. Fry.** 2006. Plasmids from freshwater environments capable of IncQ retrotransfer are diverse and include pQKH54, a new IncP-1 subgroup archetype. Microbiology. **152(Pt 9)**:2689-701.
  180. **Hall, B. G.** 2004. Predicting the evolution of antibiotic resistance genes. Nat. Rev. Microbiol. **2**:430-5. Review.
  181. **Hall, L. M., D. M. Livermore, D. Gur, M. Akova y H. E. Akalin.** 1993. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. **37(8)**:1637-44.
  182. **Hall, R. M. y C. M. Collis.** 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. Mol Microbiol. **15(4)**:593-600.
  183. **Hama, C., T. Takizawa, H. Moriwaki, Y. Urasaki y K. Mizobuchi.** 1990. Organization of the replication control region of plasmid Collb-P9. J Bacteriol. **172(4)**:1983-91.
  184. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol. **166(4)**:557-80.
  185. **Handa, N., A. Ichige, K. Kusano y I. Kobayashi.** 2000. Cellular responses to postsegregational killing by restriction-modification genes. J Bacteriol. **182(8)**:2218-29.
  186. **Harada, K. M., Y. Aso, W. Hashimoto, B. Mikami y K. Murata.** 2006. Sequence and analysis of the 46.6-kb plasmid pA1 from *Sphingomonas* sp. A1 that corresponds to the typical IncP-1beta plasmid backbone without any accessory gene. Plasmid. **56(1)**:11-23.
  187. **Hawkey, P. M.** 2008. Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia. Clin Microbiol Infect. **1**:159-65. Review.
  188. **Hayes, F.** 2003. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. Science. **301(5639)**:1496-9. Review.
  189. **Helling, R. B., T. Kinney y J. Adams.** 1981. The maintenance of plasmid-containing organisms in populations of *Escherichia coli*. J Gen Microbiol. **123(1)**:129-41.
  190. **Heritage, J., F. H. M'Zali, D. Gascoyne-Binzi y P. M. Hawke.** 1999. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother. **44(3)**:309-18. Review.
  191. **Hernández, J. R., L. Martínez-Martínez, R. Cantón, T. M. Coque, A. Pascual y Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH).** 2005. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. Antimicrob Agents Chemother. **49(5)**:2122-5.

192. Herzer, P. J., S. Inouye, M. Inouy y T. S. Whittam. 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **172(11)**:6175-81.
193. Heuer, H., R. Szczepanowski, S. Schneiker, A. Puhler, E. M. Top y A. Schluter. 2004. The complete sequences of plasmids pB2 and pB3 provide evidence for a recent ancestor of the IncP-1beta group without any accessory genes. *Microbiology.* **150(Pt 11)**:3591-9.
194. Ho, P. L., W. W. Poon, S. L. Loke, M. S. Leung, K. H. Chow, R. C. Wong, K. S. Yip, E. L. Lai y K. W. Tsang on behalf of the COMBAT study group. 2007. Community emergence of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamases among urinary *Escherichia coli* from women. *J Antimicrob Chemother.* **60(1)**:140-4.
195. Hochhut, B., K. Jahreis, J. W. Lengeler y K. Schmid. 1997. CTnscr94, a conjugative transposon found in enterobacteria. *J Bacteriol.* **179(7)**:2097-102.
196. Hochhut, B., Y. Lotfi, D. Mazel, S. M. Faruque, R. Woodgate y M. K. Waldor. 2001. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob Agents Chemother.* **45(11)**:2991-3000.
197. Hopkins, K. L., E. Liebana, L. Villa, M. Batchelor, E. J. Threlfall y A. Carattoli. 2006. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **50(9)**:3203-6.
198. Hossain, A., M. J. Ferraro, R. M. Pino, R. B. Dew III, E. S. Moland, T. J. Lockhart, K. S. Thomson, R. V. Goering y N. D. Hanson. 2004. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48(11)**:4438-4440.
199. Hughes, V. M. y N. Datta. 1983. Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. *Nature.* **302(5910)**:725-6.
200. Hujer, A. M., K. M. Hujer, M. S. Helfand, V. E. Anderson y R.A. Bonomo. 2002. Amino acid substitutions at Ambler position Gly238 in the SHV-1 beta-lactamase: exploring sequence requirements for resistance to penicillins and cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46(12)**:3971-7.
201. Ito, H., Y. Arakawa, S. Ohsuka, R. Wacharotayankun, N. Kato y M. Ohta. 1995. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>* among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* **39(4)**:824-9.
202. Jacoby, G. A. y L. Sutton. 1991. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **35(1)**:164-9.
203. Jacoby, G. A., K. E. Walsh, D. M. Mills, V. J. Walker, H. Oh, A. Robicsek y D. C. Hooper. 2006. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **50(4)**:1178-82.
204. Jain, R., M. C. Rivera, J. E. Moore y J. A. Lake. 2003. Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. *Mol Biol Evol.* **20(10)**:1598-602.
205. Jarlier, V., M. H. Nicolas, G. Fournier y A. Philippon. 1988. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* **10(4)**:867-78.
206. Jeong, S. H., I. K. Bae, S. B. Kwon, J. H. Lee, J. S. Song, H. I. Jung, K. H. Sung, S. J. Jang y S. H. Lee. 2005. Dissemination of transferable CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Korea. *J Appl Microbiol.* **98(4)**:921-7.
207. Jeong, S. H., I. K. Bae, J. H. Lee, S. G. Sohn, G. H. Kang, G. J. Jeon, Y. H. Kim, B. C. Jeong y S. H. Lee. 2004. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean nationwide survey. *J Clin Microbiol.* **42(7)**:2902-6.
208. Jeziorowski, A. y D. M. Gordon. 2007. Evolution of microcin V and colicin Ia plasmids in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **189(19)**:7045-52.
209. Johnson, J. R., A. C. Murray, M. A. Kuskowski, S. Schubert, M. F. Prère, B. Picard, R. Colodner y R. Raz. 2005. Trans-Global Initiative for Antimicrobial Resistance Investigators (TIARA) Investigators. Distribution and characteristics of *Escherichia coli* clonal group A. *Emerg Infect Dis.* **11(1)**:141-5.
210. Johnson, J. R., K. Owens, A. R. Manges y L. W. Riley. 2004. Rapid and specific detection of *Escherichia coli* clonal group A by gene-specific PCR. *J Clin Microbiol.* **42(6)**:2618-22.
211. Johnson, J. R., K. L. Owens, C. R. Clabots, S. J. Weissman y S. B. Cannon. 2006. Phylogenetic relationships among clonal groups of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as assessed by multi-locus sequence analysis. *Microbes Infect.* **8(7)**:1702-13.
212. Johnson, J. R., P. Delavari, M. Kuskowski y A. L. Stell. 2001. Phylogenetic distribution of

- extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. J Infect Dis. **183**(1):78-88.
213. Johnson, T. J., K. E. Siek, S. J. Johnson y L. K. Nolan. 2005. DNA sequence and comparative genomics of pAPEC-O2-R, an avian pathogenic *Escherichia coli* transmissible R plasmid. Antimicrob Agents Chemother. **49**(11):4681-8.
214. Johnson, T. J., S. J. Johnson y L. K. Nolan. 2006. Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. J Bacteriol. **188**(16):5975-83.
215. Johnson, T. J., Y. M. Wannemuehler, J. A. Scaccianoce, S. J. Johnson y L. K. Nolan. 2006. Complete DNA sequence, comparative genomics, and prevalence of an IncHI2 plasmid occurring among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates. Antimicrob Agents Chemother. **50**(11):3929-33.
216. Johnson, T. J., Y. M. Wannemuehler, S. J. Johnson, C. M. Logue, D. G. White, C. Doetkott y L. K. Nolan. 2007. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. Appl Environ Microbiol. **73**(6):1976-83. Erratum in: Appl Environ Microbiol. **73**(11):3768.
217. Kamachi, K., M. Sota, Y. Tamai, N. Nagata, T. Konda, T. Inoue, E. M. Top y Y. Arakawa. 2006. Plasmid pBP136 from *Bordetella pertussis* represents an ancestral form of IncP-1beta plasmids without accessory mobile elements. Microbiology. **152**(Pt 12):3477-84.
218. Kamphuis, M. B., M. C. Monti, R. H. van den Heuvel, J. López-Villarejo, R. Díaz-Orejas y R. Boelens. 2007. Structure and function of bacterial kid-kis and related toxin-antitoxin systems. Protein Pept Lett. **14**(2):113-24. Review.
219. Karim, A., L. Poirel, S. Nagarajan y P. Nordmann. 2001. Plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. FEMS Microbiol Lett. **201**(2):237-41.
220. Karisik, E., M. J. Ellington, D. M. Livermore y N. Woodford. 2008. Virulence factors in *Escherichia coli* with CTX-M-15 and other extended-spectrum beta-lactamases in the UK. J Antimicrob Chemother. **61**(1):54-8.
221. Karisik, E., M. J. Ellington, R. Pike, D. M. Livermore y N. Woodford. 2006. Development of high-level ceftazidime resistance via single-base substitutions of *bla*<sub>CTX-M-3</sub> in hyper-mutable *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Infect. **12**(8):803-6.
222. Kassis-Chikhani, N., D. Decré, V. Gautier, B. Burghoffer, F. Saliba, D. Mathieu, D. Samuel, D. Castaing, J. C. Petit, E. Dussaix y G. Arlet. 2006. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM-1 and blaSHV-5 in a French university hospital. J Antimicrob Chemother. **57**(1):142-5.
223. Kato, A. y K. Mizobuchi. 1994. Evolution of the replication regions of IncI alpha and IncFII plasmids by exchanging their replication control systems. DNA Res. **1**(5):201-12.
224. Kaufmann, M. E. 1998. Pulsed-field gel electrophoresis, p. 17-31. In N. Woodford, and A.P. Johnson (ed.), Methods in Molecular Medicine, vol 15: Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications, Humana Press Inc, Totowa, NJ.
225. Kerrn, M.B., T. Klemmensen, N. Frimodt-Møller y F. Espersen. 2002. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. J Antimicrob Chemother. **50**(4):513-6.
226. Kholodii, G., O. Yurieva, S. Mindlin, Z. Gorlenko, V. Rybochkin y V. Nikiforov. 2000. Tn5044, a novel Tn3 family transposon coding for temperature-sensitive mercury resistance. Res Microbiol. **151**(4):291-302.
227. Kholodii, G., Z. Gorlenko, S. Mindlin, J. Hobman y V. Nikiforov. 2002. Tn5041-like transposons: molecular diversity, evolutionary relationships and distribution of distinct variants in environmental bacteria. Microbiology. **148**(Pt 11):3569-82.
228. Kholodii, G. Y., O. V. Yurieva, Z. Gorlenko, S. Z. Mindlin, I. A. Bass, O. L. Lomovskaya, A. V. Kopteva y V. G. Nikiforov. 1997. Tn5041: a chimeric mercury resistance transposon closely related to the toluene degradative transposon Tn4651. Microbiology. **143**(8):2549-56.
- 228a. Kholodii, G.Y., S.Z. Mindlin, I.A. Bass, O.V. Yurieva, S.V. Minakhina, y V.G. Nikiforov. 1995. Four genes, two ends, and a res region are involved in transposition of Tn5053: a paradigm for a novel family of transposons carrying either a mer operon or an integron. Mol Microbiol. **17**(6):1189-200.
229. Kim, J., H. S. Shin, S. Y. Seol y D. T. Cho. 2002. Relationship between *bla*<sub>SHV-12</sub> and *bla*<sub>SHV-2a</sub> in Korea. J Antimicrob Chemother. **49**(2):261-7.
230. Kimura, S., M. Ishiguro, Y. Ishii, J. Alba, and K. Yamaguchi. 2004. Role of a mutation at position 167 of CTX-M-19 in ceftazidime hydrolysis. Antimicrob. Agents Chemother. **48**:1454-1460.

231. Kimura, S., Y. Ishii, K. Tateda y K. Yamaguchi. 2007. Predictive analysis of ceftazidime hydrolysis in CTX-M-type beta-lactamase family members with a mutational substitution at position 167. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **29(3)**:326-31.
232. Knothe, H., P. Shah, V. Krcmery, M. Antal y S. Mitsuhashi. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* **11(6)**:315-7.
233. Kobayashi, I. 2001. Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Res.* **29(18)**:3742-56. Review.
234. Komano, T., S. Fujitani, N. Funayama, A. Kanno y K. Sakuma. 1990. Physical and genetic analyses of IncI2 plasmid R721: evidence for the presence of shufflon. *Plasmid.* **23(3)**:248-51.
235. Kruse, H. y H. Sorum. 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4015-4021.
236. Labigne-Roussel, A., S. Briaux-Gerbaud y P. Courvalin. 1983. Tn1525, a kanamycin R determinant flanked by two direct copies of IS15. *Mol Gen Genet.* **189(1)**:90-101.
237. Laraki, N., M. Galleni, I. Thamm, M. L. Riccio, G. Amicosante, J. M. Frere y G. M. Rossolini. 1999. Structure of In31, a *bla*<sub>IMP</sub>-containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phylogenically related to In5, which carries an unusual array of gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother.* **43(4)**:890-901.
238. Lartigue, M. F., C. Zinsius, A. Wenger, J. Bille, L. Poirel y P. Nordmann. 2007. Extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M type now in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother.* **51(8)**:2855-60.
239. Lartigue, M. F., L. Poirel y P. Nordmann. 2004. Diversity of genetic environment of *bla*(CTX-M) genes. *FEMS Microbiol Lett.* **234(2)**:201-7.
240. Lartigue, M. F., N. Fortineau y P. Nordmann. 2005. Spread of novel expanded-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in a university hospital in the Paris area, France. *Clin Microbiol Infect.* **11(7)**:588-91.
241. Lartigue, M.F., L. Poirel, D. Aubert, y P. Nordmann. 2006. In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring beta-lactamase gene *bla*<sub>CTX-M</sub> of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother.* **50(4)**:1282-6.
- 241a. Lau S.H., S. Reddy, J. Cheesbrough, F.J. Bolton, G. Willshaw, T. Cheasty, A.J. Fox, M. Upton. 2008. Major uropathogenic *Escherichia coli* strain isolated in the northwest of England identified by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.* **46(3)**:1076-80.
242. Lavollay, M., K. Mamlouk, T. Frank, A. Akpabie, B. Burghoffer, S. Ben Redjeb, R. Bercion, V. Gautier y G. Arlet. 2006. Clonal dissemination of a CTX-M-15 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, Tunis, and Bangui. *Antimicrob Agents Chemother.* **50(7)**:2433-8.
243. Lawley, T. D., D. E. Taylor y T. M. Wilkins. Bacterial conjugation in Gram negative bacteria. In: *Plasmid Biology*. Funnell BE, Phillips GJ (eds). American Society for Microbiology, Washington D.C.
244. Lawrence, J. G. y H. Ochman. 1997. Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. *J Mol Evol.* **44(4)**:383-97.
245. Leavis, H. L., M. J. Bonten y R. J. Willems. 2006. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol.* **9**:454-60.
246. LeClerc, J. E., B. Li, W. L. Payne y T. A. Cebula. 1996. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science.* **274(5290)**:1208-11.
247. LeClerc, J. E., W. L. Payne, E. Kupchella, T. A. Cebula. 1998. Detection of mutator subpopulations in *Salmonella typhimurium* LT2 by reversion of his alleles. *Mutat Res.* **400(1-2)**:89-97.
248. Lee, K., D. Yong, J. H. Yum, H. H. Kim y Y. Chong. 2003. Diversity of TEM-52 extended-spectrum beta-lactamase-producing non-typhoidal *Salmonella* isolates in Korea. *J Antimicrob Chemother.* **52(3)**:493-6.
249. Leflon-Guibout, V., V. Speldooren, B. Heym, y M. Nicolas-Chanoine. 2000. Epidemiological survey of amoxicillin-clavulanate resistance and corresponding molecular mechanisms in *Escherichia coli* isolates in France: new genetic features of *bla*(TEM) genes. *Antimicrob Agents Chemother.* **44(10)**:2709-14.
250. Lenski, R. E., V. Souza, L P. Duong, Q. G. Phan, T. N. Nguyen y K. P. Bertrand. 1994. Epistatic effects of promoter and repressor functions of the Tn10 tetracycline-resistance operon of the fitness of *Escherichia coli*. *Mol Ecol.* **3(2)**:127-35.
251. Leverstein-van Hall, M. A., H. E. M. Blok, A. R. T. Donders, A. Paauw, A. C. Fluit y J. Verhoef. 2003. Multidrug resistance among *Enterobacteriaceae* is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J Infect Dis.* **187(2)**:251-9.

252. **Leverstein-Van Hall, M. A., A. Paauw, A. T. Box, H. E. Blok, J. Verhoef y A. C. Fluit.** 2002. Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. *J Clin Microbiol.* **40(8)**:3038-40.
253. **Levin, B. R. y F. M. Stewart.** 1980. The population biology of bacterial plasmids: a priori conditions for the existence of mobilizable nonconjugative factors. *Genetics.* **94(2)**:425-43.
254. **Levings, R. S., S. R. Partridge, S. P. Djordjevic y R. M. Hall.** 2007. SGI1-K, a variant of the SGI1 genomic island carrying a mercury resistance region, in *Salmonella enterica* serovar Kentucky. *Antimicrob Agents Chemother.* **51(1)**:317-23.
- 254a. **Levings, R.S, S.P. Djordjevic, y R.M. Hall.** SGI2, a relative of the Salmonella genomic island SGI1 with an independent origin.
255. **Liébana, E., M. Batchelor, K. L. Hopkins, F. A. Clifton-Hadley, C. J. Teale, A. Foster, L. Barker, E. J. Threlfall y R. H. Davies.** 2006. Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance. *J Clin Microbiol.* **44(5)**:1630-4.
256. **Liebert, C., R. M. Hall y A. O. Summers.** 1999. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**:507-22.
257. **Lili, L. N., N. F. Britton y E. J. Feil.** 2007. The persistence of parasitic plasmids. *Genetics.* **177(1)**:399-405.
258. **Lin, T. L., C. Z. Lee, P. F. Hsieh, S. F. Tsai y J. T. Wang.** 2008. Characterization of integrative and conjugative element ICEKp1-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. *J Bacteriol.* **190(2)**:515-26.
259. **Liu, S. L., A. Hessel y K. E. Sanderson.** 1993. Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90(14)**:6874-8.
260. **Livermore, D. M.** 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis.* **36(Suppl 1)**:S11-23.
261. **Livermore, D. M.** 2004. The need for new antibiotics. *Clin Microbiol Infect.* **10(4)**:1-9. Review.
262. **Livermore, D. M. y N. Woodford.** 2006. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* **14(9)**:413-20. Review.
263. **Livermore, D. M., R. Cantón, M. Gniadkowski, P. Nordmann, G. M. Rossolini, G. Arlet, J. Ayala, T. M. Coque, I. Kern-Zdanowicz, F. Luzzaro, L. Poirel y N. Woodford.** 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* **59(2)**:165-74. Review.
264. **Llosa, M. y de la Cruz F.** 2005. Bacterial conjugation: a potencial tool for genome engeneering. *Res Microbiol.* **156(1)**:1-6.
265. **Mabilat, C., J. Lourencao-Vital, S. Goussard y P. Courvalin.** 1992. A new example of physical linkage between Tn1 and Tn21: the antibiotic multiple-resistance region of plasmid pCFF04 encoding extended-spectrum beta-lactamase TEM-3. *Mol Gen Genet.* **235(1)**:113-21.
266. **Machado, E., J. Ferreira, A. Novais, L. Peixe, R. Cantón, F. Baquero y T. M. Coque.** 2007. Preservation of integron types among *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum {beta}-lactamases in a Spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003). *Antimicrob Agents Chemother.* **51(6)**:2201-4.
267. **Machado, E., R. Cantón, F. Baquero, J. C. Galán, A. Rollán, L. Peixe y T. M. Coque.** 2005. Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* **49(5)**:1823-9.
268. **Machado, E., T. M. Coque, R. Cantón, A. Novais, J. C. Sousa, F. Baquero y L. Peixe.** 2007. Portuguese Resistance Study Group. High diversity of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. *J Antimicrob Chemother.* **60(6)**:1370-4.
269. **Mahillon, J. y M. Chandler.** 1998. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62(3)**:725-74. Review.
270. **Mahillon, J., C. Léonard y M. Chandler.** 1999. IS elements as constituents of bacterial genomes. *Res Microbiol.* **150(9-10)**:675-87. Review.
271. **Mammeri, H., M. Van De Loo, L. Poirel, L. Martinez-Martinez y P. Nordmann.** 2005. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* **49(1)**:71-6.
272. **Manges, A. R., J. R. Johnson, B. Foxman, T. T. O'Bryan, K. E. Fullerton y L. W. Riley.** 2001. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *N Engl J Med.* **345(14)**:1007-13.
273. **Maniati, M., A. Ikonomidis, P. Mantzana, A. Daponte, A. N. Maniatis y S. Pournaras.** 2007. A highly carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate with a novel blaVIM-4/blaP1b integron overexpresses two efflux pumps and lacks OprD. *J Antimicrob Chemother.* **60(1)**:132-5.

274. Mantengoli, E. y G. M. Rossolini. 2005. Tn5393d, a complex Tn5393 derivative carrying the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase gene and other resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* **49(8)**:3289-96.
275. Marchandin, H., C. Carriere, D. Sirot, H. J. Pierre y H. Darbas. 1999. TEM-24 produced by four different species of *Enterobacteriaceae*, including *Providencia rettgeri*, in a single patient. *Antimicrob Agents Chemother.* **43(8)**:2069-73.
276. Marchandin H., S. Godreuil, H. Darbas, H. Jean-Pierre, E. Jumas-Bilak, C. Chanal y R. Bonnet. 2003. Extended-spectrum beta-lactamase TEM-24 in an *Aeromonas* clinical strain: acquisition from the prevalent *Enterobacter aerogenes* clone in France. *Antimicrob Agents Chemother.* **47(12)**:3994-5.
277. Marchandin, H., H. Jean-Pierre, C. De Champs, D. Sirot, H. Darbas, P. F. Perigault y C. Carriere. 2000. Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **44(1)**:213-6.
278. Martinez, B., J. Tomkins, L. P. Wackett, R. Wing y M. J. Sadowsky. 2001. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *J Bacteriol.* **183(19)**:5684-97.
279. Martínez, J. L., F. Baquero, y D. I. Andersson. 2007. Predicting antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* **5(12)**:958-65. Review.
280. Martinez-Freijo, P., A. C. Fluit, F. J. Schmitz, J. Verhoef y M. E. Jones. 1999. Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* **43(3)**:686-9.
281. Martínez-Martínez, L., A. Pascual, y G. A. Jacoby. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* **351(9105)**:797-9.
282. Massova, I., y S. Mobashery. 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **42(1)**:1-17. Review.
283. Matsumoto Y., F. Ikeda, T. Kamimura, Y. Yokota y Y. Mine. 1988. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* **32(8)**:1243-6.
284. Matsumoto, Y. y M. Inoue. 1999. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **43(2)**:307-13.
285. Matthew, M., R.W. Hedges y J.T. Smith. 1979. Types of beta-lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* **138(3)**:657-62.
286. Mazel, D. 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol.* **4(8)**:608-20. Review.
287. McBride, S. M., V. A. Fischetti, D. J. Leblanc, R. C. Jr Moellering y M. S. Gilmore. 2007. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS ONE.* **2(7)**:e582.
288. McDermott, P. F., R. D. Walker y D. G. White. 2003. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *Int J Toxicol.* **22(2)**:135-43. Review.
289. Mena, A., V. Plasencia, L. García, O. Hidalgo, J. I. Ayestarán, S. Alberti, N. Borrell, J. L. Pérez y A. Oliver. 2006. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *J Clin Microbiol.* **44(8)**:2831-7.
290. Merlin, C., D. Springael y A. Toussaint. 1999. Tn4371: A modular structure encoding a phage-like integrase, a *Pseudomonas*-like catabolic pathway, and RP4/Ti-like transfer functions. *Plasmid.* **41(1)**: 40-54.
291. Mesa, R. J., V. Blanc, A. R. Blanch, P. Cortés, J. J. González, S. Lavilla, E. Miró, M. Muniesa, M. Saco, M. T. Tórtola, B. Mirelis, P. Coll, M. Llagostera, G. Prats y F. Navarro. 2006. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother.* **58(1)**:211-5.
292. Milch, H., S. Nikolnikov y E. Czirok. 1984. *Escherichia coli* Col V plasmids and their role in pathogenicity. *Acta Microbiol Hung.* **31(2)**:117-25.
293. Minakhina, S., G. Kholodii, S. Mindlin, O. Yurieva y V. Nikiforov. 1999. Tn5053 family transposons are res site hunters sensing plasmidal res sites occupied by cognate resolvases. *Mol Microbiol.* **33(5)**:1059-68.
294. Mindlin, S., G. Kholodii, Z. Gorlenko, S. Minakhina, L. Minakhin, E. Kalyaeva, A. Kopteva, M. Petrova, O. Yurieva y V. Nikiforov. 2001. Mercury resistance transposons of gram-negative environmental bacteria and their classification. *Res Microbiol.* **152(9)**:811-22.
295. Mindlin, S., L. Minakhin, M. Petrova, G. Kholodii, S. Minakhina, Z. Gorlenko y V. Nikiforov. 2005. Present-day mercury resistance transposons are common in bacteria preserved in permafrost grounds since the

- Upper Pleistocene. Res Microbiol. **156(10)**:994-1004.
296. Miró, E., B. Mireli, F. Navarro, A. Rivera, R. J. Mesa, M. C. Roig, L. Gómez y P. Coll. 2005. Surveillance of extended-spectrum beta-lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. J Antimicrob Chemother. **56(6)**:1152-5.
297. Modi, R. I., L. H. Castilla, S. Puskas-Rozsa, R. B. Helling y J. Adams. 1992. Genetic changes accompanying increased fitness in evolving populations of *Escherichia coli*. Genetics. **130(2)**:241-9.
298. Morosini, M. I., J. Blazquez, M. C. Negri, R. Cantón, E. Loza y F. Baquero. 1996. Characterization of a nosocomial outbreak involving an epidemic plasmid encoding for TEM-27 in *Salmonella enterica* subspecies enterica serotype Othmarschen. J Infect Dis. **174(5)**:1015-20.
299. Mugnaioli, C., F. Luzzaro, F. De Luca, G. Brigante, M. Perilli, G. Amicosante, S. Stefani, A. Toniolo y G. M. Rossolini. 2006. CTX-M-Type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. Antimicrob Agents Chemother. **50(8)**:2700-6.
300. Mulvey, M. R., E. Bryce, D. Boyd, M. Ofner-Agostini, S. Christianson, A. E. Simor, S. Paton y Canadian Hospital Epidemiology Committee, Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, Health Canada. 2004. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian hospitals. Antimicrob Agents Chemother. **48(4)**:1204-14.
301. Mullany, P., A. P. Roberts y H. Wang. 2002. Mechanism of integration and excision in conjugative transposons. Cell Mol Life Sci. **59(12)**:2017-22. Review.
302. Munday, C. J., D. A. Boyd, N. Brenwald, M. Miller, J. M. Andrews, R. Wise, M. R. Mulvey y P. M. Hawkey. 2004. Molecular and kinetic comparison of the novel extended-spectrum beta-lactamases CTX-M-25 and CTX-M-26. Antimicrob Agents Chemother. **48(12)**:4829-34.
303. Murata, T., M. Ohnishi, T. Ara, J. Kaneko, C. G. Han, Y. F. Li, K. Takashima, H. Nojima, K. Nakayama, A. Kaji, Y. Kamio, T. Miki, H. Mori, E. Ohtsubo, Y. Terawaki y T. Hayashi. 2002. Complete nucleotide sequence of plasmid Rts1: implications for evolution of large plasmid genomes. J Bacteriol. **184(12)**:3194-202.
304. Murray, P. R., E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller y R. H. Tenover (ed.). 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed., vol. 1, p. 646-647. ASM Press, Washington, USA.
305. Naas, T. y P. Nordmann. 1999. OXA-type beta-lactamases. Curr Pharm De. **5**:865-879.
306. Naas, T., D. Aubert, T. Lambert y P. Nordmann. 2006. Complex genetic structures with repeated elements, a sul-type class 1 integron, and the *bla*<sub>VEB</sub> extended-spectrum beta-lactamase gene. Antimicrob Agents Chemother. **50(5)**:1745-52.
307. Naas, T., G. Cuzon, M. V. Villegas, M. F. Lartigue, J. P. Quinn y P. Nordmann. 2008. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla*<sub>KPC</sub> gene. Antimicrob Agents Chemother. **52(4)**:1257-63.
308. Naas, T., L. Poirel y P. Nordmann. 2008. Minor extended-spectrum beta-lactamases. Clin Microbiol Infect. **14(1)**:42-52. Review.
309. Nakaya, R., A. Nakamura y Y. Murata. 1960. Resistance transfer agents in *Shigella*. Biochem Biophys Res Commun. **3**:654-9.
310. Nandi, S., J. J. Maurer, C. Hofacre y A. O. Summers. 2004. Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. Proc Natl Acad Sci U S A. **101(18)**:7118-22.
311. Neuwirth, C., E. Siebor, A. Pechinot, J. M. Duez, M. Pruneaux, F. Garel, A. Kazmierczak y R. Labia. 2001. Evidence of *in vivo* transfer of a plasmid encoding the extended-spectrum beta-lactamase TEM-24 and other resistance factors among different members of the family *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. **39(5)**:1985-8.
312. Neuwirth, C., E. Siebor, J. Lopez, A. Pechinot y A. Kazmierczak. 1996. Outbreak of TEM-24-producing *Enterobacter aerogenes* in an intensive care unit and dissemination of the extended-spectrum beta-lactamase to other members of the family *enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. **34(1)**:76-9.
313. Newnham P. J. y D. E. Taylor. 1994. Molecular analysis of RepH1A, a minimal replicon of the IncH1 plasmid R27. Mol Microbiol. **11(4)**:757-68.
314. Nicolas-Chanoine, M. H., J. Blanco, V. Leflon-Guibout, R. Demarty, M. P. Alonso, M. M. Caniça, Y. J. Park, J. P. Lavigne, J. Pitout y J. R. Johnson. 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. J Antimicrob Chemother. **61(2)**:273-81.
315. Nicolas-Chanoine, M. H., V. Jarlier y 'La Collégiale de Bactériologie-Virologie-Hygiène Hospitalière de l'Assistance Publique, Hôpitaux de Paris, France. 2008. Extended-spectrum beta-lactamases in long-term-care facilities. Clin Microbiol Infect. **14 suppl 1**:111-6. Review.
316. Nieto, C., R. Giraldo, E. Fernandez-Tresguerres y R. Diaz. 1992. Genetic and functional analysis of the basic replicon of



- pPS10, a plasmid specific for *Pseudomonas* isolated from *Pseudomonas syringae* patovar *savastanoi*. J Mol Biol. **223(2)**:415-26.
317. Nishi, A., K. Tominaga y K. Furukawa. 2000. A 90-kilobase conjugative chromosomal element coding for biphenyl and salicylate catabolism in *Pseudomonas putida* KF715. J Bacteriol. **182(7)**:1949-55.
318. Nordmann, P., E. Ronco, T. Naas, C. Dupont, Y. Michel-Briand y R. Labia. 1993. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. **37**:962-9.
319. Nordmann, P., y L. Poirel. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect. **8(6)**:321-31. Review.
320. Novais, A., R. Cantón, R. Moreira, L. Peixe, F. Baquero y T. M. Coque. 2007. Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. Antimicrob Agents Chemother. **51(2)**:796-9.
321. Novais, A., R. Cantón, A. Valverde, F. Baquero, y T. M. Coque. Population structure of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*. 2<sup>nd</sup> FEMS Congress of European Microbiologists. 2006. Madrid. Spain.
322. Novais, A., R. Cantón, A. Valverde, E. Machado, J. C. Galán, L. Peixe, A. Carattoli, F. Baquero y T. M. Coque. 2006. Dissemination and persistence of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-alpha, and IncFI groups. Antimicrob Agents Chemother. **50(8)**:2741-50.
323. Novais, A., R. Cantón, T. M. Coque, A. Moya, F. Baquero y J.C. Galán. 2008. Mutational events in ESBL-ceftoximases of the CTX-M-1 cluster involved in ceftazidime resistance. Antimicrob Agents Chemother. **52** (7) Apr 28. [Epub ahead of print]
324. Novick, R. P. 1987. Plasmid incompatibility. Microbiol Rev. **51(4)**:381-95. Review.
325. Ochman, H. y R. K. Selander. 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. J Bacteriol. **157(2)**:690-3.
326. Ochman, H., J. G. Lawrence y E. A. Groisman. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature. **405(6784)**:299-304.
327. Oliver, A., F. Baquero y J. Blázquez. 2002. The mismatch repair system (mutS, mutL and uvrD genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. Mol Microbiol. **43(6)**:1641-50.
328. Oliver, A., J. C. Pérez-Díaz, T. M. Coque, F. Baquero y R. Cantón. 2001. Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. Antimicrob Agents Chemother. **45(2)**:616-20.
329. Oliver, A., T. M. Coque, D. Alonso, A. Valverde, F. Baquero y R. Cantón. 2005. CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among *Enterobacteriaceae* in a Spanish hospital. Antimicrob. Agents Chemother. **49(4)**:1567-71.
330. Olson, A. B., M. Silverman, D. A. Boyd, A. McGeer, B. M. Willey, V. Pong-Porter, N. Daneman y M. R. Mulvey. 2005. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. Antimicrob. Agents Chemother. **49(5)**:2112-2115.
331. Oppegaard, H., T. M. Steinum y Y. Wasteson. 2001. Horizontal transfer of a multi-drug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment. Appl. Environ. Microbiol. **67(8)**:3732-3734.
332. Orellana, M. C., J. S. Yoon, J. E. Ness, W. P. Stemmer y R. C. Stevens. 2001. Predicting the emergence of antibiotic resistance by directed evolution and structural analysis. Nat Struct Biol. **8(3)**:238-42.
333. Osborn, M., S. Bron, N. Firth, S. Holsappel, A. Huddleston, R. Kiewiet, W. Meijer, J. Segers, R. Skurray, P. Terpstra, C.M. Thomas, P. Thorsted, E. Tietze, and S.L. Turner. 2000. The Evolution of bacterial plasmids. In: The Horizontal Gene Pool: Bacterial plasmids and gene spread. C. M. Thomas (ed). Hardwood Academic Publishers. Amsterdam, pp: 301-361.
334. Osborn, A. M., F. M. da Silva Tatley, L. M. Steyn, R. W. Pickup y J. R. Saunders. 2000. Mosaic plasmids and mosaic replicons: evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons. Microbiology. **146** (Pt 9):2267-75.
335. Osborn, A. M. y D. Boltner. 2002. When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative- and mobilizable-transposons as a mosaic continuum. Plasmid. **48(3)**:202-12.
336. Osborn, A. M., K. D. Bruce, P. Strike y D. A. Ritchie. 1997. Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (mer) operon. FEMS Microbiol Rev. **19(4)**:239-62.
337. Oteo, J., C. Navarro, E. Cercenado, A. Delgado-Iribarren, I. Wilhelmi, B. Orden, C. García, S. Miguelañez, M. Pérez-

- Vázquez, S. García-Cobos, B. Aracil, V. Bautista y J. Campos. 2006. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol.* **44(7)**:2359-66.
338. Oteo, J., E. Garduño, V. Bautista, O. Cuevas y J. Campos y Spanish members of European Antimicrobial Resistance Surveillance System. 2008. Antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Spain: analyses of 718 invasive isolates from 35 hospitals and report of one outbreak caused by an SHV-12-producing strain. *J Antimicrob Chemother.* **61(1)**:222-4.
339. Ouazzani Chahdi, A., P. Gabant y M. Couturier. 1997. Molecular analysis of RepH11B, a replicon specific to IncHI1 plasmids. *Mol Gen Genet.* **255(5)**:477-86.
340. Pallecchi, L., C. Lucchetti, A. Bartoloni, F. Bartalesi, A. Mantella, H. Gamboa, A. Carattoli, F. Paradisi y G.M. Rossolini. 2007. Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother.* **51(4)**:1179-84.
341. Pansegrau, W., E. Lanka, P. T. Barth, D. H. Figurski, D. G. Guiney, D. Haas, D. R. Helinski, H. Schwab, V. A. Stanisich y C. M. Thomas. 1994. Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP alpha plasmids. Compilation and comparative analysis. *J Mol Biol.* **239(5)**:623-63.
342. Parkhill, J., G. Dougan, K. D. James, N. R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, K. L. Mungall, S. D. Bentley, M. T. Holden, M. Sebaihia, S. Baker, D. Basham, K. Brooks, T. Chillingworth, P. Connerton, A. Cronin, P. Davis, R. M. Davies, L. Dowd, N. White, J. Farrar, T. Feltwell, N. Hamlin, A. Haque, T. T. Hien, S. Holroyd, K. Jagels, A. Krogh, T. S. Larsen, S. Leather, S. Moule, P. O'Gaora, C. Parry, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead y B. G. Barrell. 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature.* **413(6858)**:848-52.
343. Partridge, S. R. y R. M. Hall. 2003. The IS1111 family members IS4321 and IS5075 have subterminal inverted repeats and target the terminal inverted repeats of Tn21 family transposons. *J Bacteriol.* **185(21)**:6371-84.
344. Partridge, S. R. y R. M. Hall. 2004. Complex multiple antibiotic and mercury resistance region derived from the r-det of NR1 (R100). *Antimicrob Agents Chemother.* **48(11)**:4250-5.
345. Partridge, S. R. y R. M. Hall. 2005. Evolution of transposons containing *bla*<sub>TEM</sub> genes. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**:1267-8.
346. Partridge, S. R., G. D. Recchia, H. W. Stokes y R. M. Hall. 2001. Family of class 1 integrons related to In4 from Tn1696. *Antimicrob Agents Chemother.* **45(11)**:3014-20.
347. Partridge, S. R., H. J. Brown, H. W. Stokes y R. M. Hall. 2001. Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. *Antimicrob Agents Chemother.* **45(4)**:1263-70.
348. Partridge, S. y R. M. Hall. 2003. In34, a complex In5 family class 1 integron containing orf513 and *dfrA10*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47(1)**:342-9.
349. Partridge, S. R., H. J. Brown y R. M. Hall. 2002. Characterization and movement of the class 1 integron known as Tn2521 and Tn1405. *Antimicrob Agents Chemother.* **46(5)**:1288-94.
350. Pasquali, F., C. Kehrenberg, G. Manfreda y S. Schwarz. 2005. Physical linkage of Tn3 and part of Tn1721 in a tetracycline and ampicillin resistance plasmid from *Salmonella Typhimurium*. *J Antimicrob Chemother.* **55(4)**:562-5.
351. Paterson, D. L. 2006. Resistance in Gram negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Infect Control.* **34 (6 Suppl 1)**: S20-8; discussion S62-70. Review.
352. Paterson, D. L. 2006. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Infect Control.* **34(5 Suppl 1)**:S20-8; discussion S64-73. Review.
353. Paterson, D. L. y R. A. Bonomo. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* **18(4)**:657-86. Review.
354. Pembroke, J. T. y D. B. Murphy. 2000. Isolation and analysis of a circular form of the IncJ conjugative transposon-like elements, R391 and R997: implications for IncJ incompatibility. *FEMS Microbiol Lett.* **187(2)**:133-8.
355. Pembroke, J. T., C. MacMahon y B. McGrath. 2002. The role of conjugative transposons in the *Enterobacteriaceae*. *Cell Mol Life Sci.* **59(12)**:2055-64.
356. Perez, F., A. Endimiani, K. M. Hujer y R. A. Bonomo. 2007. The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol.* **7(5)**:459-69.
357. Perilli, M., B. Segatore, M. R. de Massis, M. L. Riccio, C. Bianchi, A. Zollo, G. M. Rossolini y G. Amicosante. 2000. TEM-72, a new extended-spectrum beta-lactamase detected in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* in Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* **44(9)**:2537-9.

358. Perilli, M., E. Dell'Amico, B. Segatore, M. R. de Massis, C. Bianchi, F. Luzzaro, G. M. Rossolini, A. Toniolo, G. Nicoletti y G. Amicosante. 2002. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from an Italian nationwide survey. *J Clin Microbiol.* **40(2)**:611-4.
359. Persson, C., E.G. Wagner y K. Nordstrom. 1990. Control of replication of plasmid R1: structures and sequences of the antisense RNA, CopA, required for its binding to the target RNA, copT. *EMBO J.* **9(11)**:3767-75.
360. Petit, A., G. Gerbaud, D. Sirot, P. Courvalin y J. Sirot. 1990. Molecular epidemiology of TEM-3 (CTX-1) beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* **34(2)**:219-24.
361. Philippon, A., G. Arlet y G. A. Jacoby. 2002. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **46(1)**:1-11. Review.
362. Philippon, A., R. Labia y G. Jacoby. 1989. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **33(8)**:1131-6. Review.
363. Picard, B., J. S. Garcia, S. Gouriou, P. Duriez, N. Brahimi, E. Bingen, J. Elion y E. Denamur. 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect. Immun.* **67**:546-553.
364. Pickard, D., J. Wain, S. Baker, A. Line, S. Chohan, M. Fookes, A. Barron, P. O. Gaora, J. A. Chabalgoity, N. Thanky, C. Scholes, N. Thomson, M. Quail, J. Parkhill y G. Dougan. 2003. Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding *Salmonella enterica* pathogenicity island SPI-7. *J Bacteriol.* **185(17)**:5055-65.
365. Pino, I. C., Y. M. Dominguez, R. G. Gonzalez, T. H. Bello, A. M. Sepulveda, M. S. Mella, M. C. Zemelman y Z. R. Zemelman. 2007. Extended spectrum ss-lactamases (ESBL) production in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from Chilean hospitals belonging to VIII Region. *Rev Chilena Infectol.* **24(2)**:137-141.
366. Pitout, J. D., K. B. Laupland, D. L. Church, M. L. Menard y J. R. Johnson. 2005. Virulence factors of *Escherichia coli* isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **49(11)**:4667-70.
367. Pitout, J. D., D. B. Gregson, D. L. Church, S. Elsayed y K. B. Laupland. 2005. Community-wide outbreaks of clonally related CTX-M-14 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the Calgary health region. *J Clin Microbiol.* **43(6)**:2844-9.
368. Pitout, J. D., P. Nordmann, K. B. Laupland y L. Poirel. 2005. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother.* **56(1)**:52-9. Review.
369. Poirel, L., C. Leviandier y P. Nordmann. 2006. Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* **50(12)**:3992-7.
370. Poirel, L., E. Lebessi, M. Castro, C. Fevre, M. Foustoukou y P. Nordmann. 2004. Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrob Agents Chemother.* **48(6)**:2277-9.
371. Poirel, L., I. Le Thomas, T. Naas, A. Karim, y P. Nordmann. 2000. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **44(3)**:622-32.
372. Poirel, L., J. W. Decousser y P. Nordmann. 2003. Insertion sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a *bla*(CTX-M) beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* **47(9)**:2938-45.
373. Poirel, L., L. Brinas, A. Verlinde, L. Ide y P. Nordmann. 2005. BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **49(9)**:3743-8.
374. Poirel, L., L. Cabanne, L. Collet y P. Nordmann. 2006. Class II transposon-borne structure harboring metallo-beta-lactamase gene *bla*<sub>VIM-2</sub> in *Pseudomonas putida*. *Antimicrob Agents Chemother.* **50(8)**:2889-91.
375. Poirel, L., M. F. Lartigue, J. W. Decousser y P. Nordmann. 2005. *ISEcp1B*-mediated transposition of *bla*<sub>CTX-M</sub> in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* **49(1)**:447-50.
376. Poirel, L., M. Gniadkowski y P. Nordmann. 2002. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**:1031-34.
377. Poirel, L., T. Naas y P. Nordmann. 2008. Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* **14(1)**:75-81. Review.
378. Poirel, L., T. Naas, I. Le Thomas, A. Karim, E. Bingen y P. Nordmann. 2001. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the *omega loop*. *Antimicrob Agents Chemother.* **45(12)**:3355-61.

379. **Poirel, L., T. Naas, M. Guibert, E. B. Chaibi, R. Labia y P. Nordmann.** 1999. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother.* **43(3)**:573-81.
380. **Poole, K.** 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* **10(1)**:12-26. Review.
381. **Praszkier, J., T. Wei, K. Siemering y J. Pittard.** 1991. Comparative analysis of the replication regions of IncB, IncK, and IncZ plasmids. *J Bacteriol.* **173(7)**:2393-7.
382. **Preston, K. E. y R. A. Venezia.** 1999. Restriction map and properties of *Klebsiella oxytoca* plasmid pACM1. *Plasmid.* **42(2)**:92-103.
383. **Preston, K. E., R. A. Venezia y K. A. Stellrecht.** 2004. The SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase gene of pACM1 is located on the remnant of a compound transposon. *Plasmid.* **51(1)**:48-53.
384. **Queenan, A. M. y K. Bush.** 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* **20(3)**:440-58, table of contents. Review.
385. **Quinteros, M., M. Radice, N. Gardella, M. M. Rodriguez, N. Costa, D. Korbenfeld, E. Couto, G. Gutkind y Microbiology Study Group.** 2003. Extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* **47(9)**:2864-7.
386. **Rådström, P., G. Swedberg y O. Sköld.** 1991. Genetic analyses of sulfonamide resistance and its dissemination in gram-negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution. *Antimicrob Agents Chemother.* **35(9)**:1840-8.
387. **Radstrom, P., O. Skold, G. Swedberg, J. Flensburg, P. H. Roy y L. Sundstrom.** 1994. Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *J Bacteriol.* **176(11)**:3257-68.
388. **Rasheed, J. K., J. W. Biddle, K. F. Anderson, L. Washer, C. Chenoweth, J. Perrin, D. W. Newton y J. B. Patel.** 2008. Detection of the KPC-2 carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *Klebsiella oxytoca* carrying a common plasmid. *J Clin Microbiol.* 2008 Apr 2. [Epub ahead of print]
389. **Rawlings, D. E. y E. Tietze.** 2001. Comparative biology of IncQ and IncQ-like plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* **65(4)**:481-96, table of contents. Review.
390. **Recchia, G. D. y R. M. Hall.** 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology.* **141 (Pt 12)**:3015-27. Review.
391. **Revilla, C., M. P. Garcillán-Barcia, R. Fernández-López, N. R. Thomson, M. Sanders, M. Cheung, C. M. Thomas y F. de la Cruz.** 2008. Different pathways to acquiring resistance genes illustrated by the recent evolution of IncW plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* **52(4)**:1472-80.
392. **Rhodes, G., J. Parkhill, C. Bird, K. Ambrose, M. C. Jones, G. Huys, J. Swings, y R. W. Pickup.** 2004. Complete nucleotide sequence of the conjugative tetracycline resistance plasmid pFBAOT6, a member of a group of IncU plasmids with global ubiquity. *Appl Environ Microbiol.* **70(12)**:7497-510.
393. **Riaño, I., M. A. Moreno, T. Teshager, Y. Sáenz, L. Domínguez y C. Torres.** 2006. Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain. *J Antimicrob Chemother.* **58(4)**:844-7.
394. **Rice, L. B.** 1998. Tn916 family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**:1871-7.
395. **Rice, L. B.** 2002. Association of different mobile elements to generate novel integrative elements. *Cell Mol Life Sci.* **59(12)**:2023-32.
396. **Richmond, M. H. y R. B. Sykes.** 1973. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol.* **9**:31-88. Review.
397. **Rijavec, M., M. Starcic Erjavec, J. Ambrozic Avgustin, R. Reissbrodt, A. Fruth, V. Krizan-Hergouth y D. Zgur-Bertok.** 2006. High prevalence of multidrug resistance and random distribution of mobile genetic elements among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the four major phylogenetic groups. *Curr Microbiol.* **53(2)**:158-62.
398. **Riley, M. A. y D. M. Gordon.** 1992. A survey of Col plasmids in natural isolates of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of Col-plasmid lineages. *J Gen Microbiol.* **138(7)**:1345-52.
399. **Robicsek, A., J. Strahilevitz, G. A Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, C. H. Park, K. Bush y D. C. Hooper.** 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med.* **12(1)**:83-8.
400. **Robin, F., J. Delmas, M. Archambaud, C. Schweitzer, C. Chanal y R. Bonnet.** 2006. CMT-type beta-lactamase TEM-125, an emerging problem for extended-spectrum beta-lactamase detection. *Antimicrob Agents Chemother.* **50(7)**:2403-2408.
401. **Robinson, D. A., A. M. Kearns, A. Holmes, D. Morrison, H. Grundmann, G. Edwards, F. G. O'Brien, F. C. Tenover, L. K.**

- McDougal, A. B. Monk y M. C. Enright. 2005. Re-emergence of early pandemic *Staphylococcus aureus* as a community-acquired methicillin-resistant clone. *Lancet*. **2-8**;365:1256-8.
402. Rochelle, P. A., J. C. Fry, M. J. Day y M. J. Bale. 1985. An accurate method for estimating sizes of small and large plasmids and DNA fragments by gel electrophoresis. *J Gen Microbiol*. **132**:53-9.
403. Rodríguez, M. M., P. Power, M. Radice, C. Vay, A. Famiglietti, M. Galleni, J. A. Ayala, and G. Gutkind. 2004. Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother*. **48**(12):4895-4897.
404. Rodríguez-Baño, J., M. D. Navarro, L. Romero, M. A. Muniain, E. J. Perea, R. Pérez-Cano, J. R. Hernández y A. Pascual. 2006. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control. *Clin Infect Dis*. **42**(1):37-45.
405. Rodríguez-Baño, J., M. D. Navarro, L. Romero, M. A. Muniain, M. Cueto, J. Gálvez, E. J. Perea y A. Pascual. 2008. Risk-factors for emerging bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect*. **14**(2):180-3.
406. Rodríguez-Martínez, J. M. 2005. [Mechanisms of plasmid-mediated resistance to quinolones] *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **23**(1):25-31. Review. Spanish.
407. Romero, L., L. López, J. Rodríguez-Baño, J. Ramón Hernández, L. Martínez-Martínez y A. Pascual. 2005. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. **11**(8):625-31.
408. Rossolini, G. M., M. M. D'Andrea y C. Mugnaioli. 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*. **14 Suppl 1**:33-41.
409. Rowe-Magnus, D. A. y D. Mazel. 2002. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol*. **292**(2):115-25. Review.
410. Sabaté, M., F. Navarro, E. Miro, S. Campoy, B. Mirelis, J. Barbe y G. Prats. 2002. Novel complex *sul1*-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla*(CTX-M-9). *Antimicrob Agents Chemother*. **46**(8):2656-61.
411. Sabaté, M., R. Tarragó, F. Navarro, E. Miró, C. Vergés, J. Barbé y G. Prats. 2000. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. **44**(7):1970-3.
412. Saladin, M., V.T. Cao, T. Lambert, J.L. Donay, J.L. Herrmann, Z. Ould-Hocine, C. Verdet, F. Delisle, A. Philippon y G. Arlet. 2002. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett*. **209**(2):161-8.
413. Salyers, A. A., N. B. Shoemaker, A. M. Stevens y L. Y. Li. 1995. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol Rev*. **59**(4):579-90. Review.
414. Sambrook, J., E. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
415. Schluter, A., H. Heuer, R. Szczepanowski, L. J. Forney, C. M. Thomas, A. Puhler y E. M. Top. 2003. The 64 508 bp IncP-1beta antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a waste-water treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1beta group. *Microbiology*. **149**(Pt 11):3139-53.
416. Schluter, A., H. Heuer, R. Szczepanowski, S. M. Pöler, S. Schneck, A. Puhler y E. M. Top. 2005. Plasmid pB8 is closely related to the prototype IncP-1beta plasmid R751 but transfers poorly to *Escherichia coli* and carries a new transposon encoding a small multidrug resistance efflux protein. *Plasmid*. **54**(2):135-48.
417. Schluter, A., I. Krahn, F. Kollin, G. Bonemann, M. Stiens, R. Szczepanowski, S. Schneck y A. Puhler. 2007. IncP-1{beta} plasmid pGNB1 isolated from a bacterial community of a wastewater treatment plant mediates decolorization of triphenylmethane dyes. *Appl Environ Microbiol*. **73**(20):6345-50.
418. Schneck, S., M. Keller, M. Droge, E. Lanka, A. Puhler y W. Selbitschka. 2001. The genetic organization and evolution of the broad host range mercury resistance plasmid pSB102 isolated from a microbial population residing in the rhizosphere of alfalfa. *Nucleic Acids Res*. **29**(24):5169-81.
419. Scholz, P., V. Haring, B. Wittmann-Liebold, K. Ashman, M. Bagdasarian y E. Scherzinger. 1989. Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene*. **75**(2):271-88.
420. Schubert, S., A. Rakin y J. Heesemann. 2004. The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int J Med Microbiol*. **294**(2-3):83-94. Review.

421. Schubert, S., S. Dufke, J. Sorsa y J. Heesemann. 2004. A novel integrative and conjugative element (ICE) of *Escherichia coli*: the putative progenitor of the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Mol Microbiol.* **51(3)**:837-48.
422. Schwartz, D. C. y C. R. Cantor. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* **37(1)**:67-75.
423. Sherburne, C. K., T. D. Lawley, M. W. Gilmour, F. R. Blattner, V. Burland, E. Grotbeck, D. J. Rose y D. E. Taylor. 2000. The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. *Nucleic Acids Res.* **28(10)**:2177-86.
424. Sherley, M., D. M. Gordon y P. J. Collignon. 2003. Species differences in plasmid carriage in the *Enterobacteriaceae*. *Plasmid.* **49(1)**:79-85.
425. Sherley, M., D. M. Gordon y P. J. Collignon. 2004. Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. *Microbiology.* **150(Pt 5)**:1539-46.
426. Shi, L., K. Fujihara, T. Sato, H. Ito, P. Garg, R. Chakrabarty, T. Ramamurthy, G. B. Nair, Y. Takeda y S. Yamasaki. 2006. Distribution and characterization of integrons in various serogroups of *Vibrio cholerae* strains isolated from diarrhoeal patients between 1992 and 2000 in Kolkata, India. *J Med Microbiol.* **55(Pt 5)**:575-83.
427. Silva, J., C. Aguilar, G. Ayala, M. A. Estrada, U. Garza-Ramos, R. Lara-Lemus y L. Ledezma. 2000. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* **44(4)**:997-1003.
428. Simonsen, L., D. M. Gordon, F. M. Stewart y B. R. Levin. 1990. Estimating the rate of plasmid transfer: an end-point method. *J Gen Microbiol.* **136(11)**:2319-25.
429. Sinclair, M. I. y B. W. Holloway. 1982. A chromosomally located transposon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **151(2)**:569-79.
430. Sirot, D., J. Sirot, R. Labia, A. Morand, P. Courvalin, A. Darfeuille-Michaud, R. Perroux y R. Cluzel. 1987. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* **20(3)**:323-34.
431. Smalla, K., A. S. Haines, K. Jones, E. Krogerrecklenfort, H. Heuer, M. Schlöter y C. M. Thomas. 2006. Increased abundance of IncP-1beta plasmids and mercury resistance genes in mercury-polluted river sediments: first discovery of IncP-1beta plasmids with a complex mer transposon as the sole accessory element. *Appl Environ Microbiol.* **72(11)**:7253-9.
432. Smarda, J. y D. Smajs. 1998. Colicins--exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol (Praha).* **43(6)**:563-82.
433. Smith, J. L., D. J. Drum, Y. Dai, J. M. Kim, S. Sanchez, J. J. Maurer, C. L. Hofacre y M. D. Lee. 2007. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl Environ Microbiol.* **73(5)**:1404-14.
434. Smith, J. M., N. H. Smith, M. O'Rourke y B. G. Spratt. 1993. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90(10)**:4384-8.
- 434a. Smith, C.L. y C.R. Cantor. 1987. Purification, specific fragmentation, and separation of large DNA molecules. *Methods Enzymol.* **155**: 449-467.
435. Sota, M., H. Kawasaki y M. Tsuda. 2003. Structure of haloacetate-catabolic IncP-1beta plasmid pUO1 and genetic mobility of its residing haloacetate-catabolic transposon. *J Bacteriol.* **185(22)**:6741-5.
436. Souza, V., M. Rocha, A. Valera y L. E. Eguiarte. 1999. Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *Appl Environ Microbiol.* **65(8)**:3373-85.
437. Souza, V., M. Travisano, P. E. Turner y L. E. Eguiarte. 2002. Does experimental evolution reflect patterns in natural populations? *E. coli* strains from long-term studies compared with wild isolates. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **81(1-4)**:143-53. Review.
438. Spratt, B. G., P. J. Hedge, S. te Heesen, A. Edelman y J. K. Broome-Smith. 1986. Kanamycin-resistant vectors that are analogues of plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9. *Gene.* **41(2-3)**:337-42.
439. Stanisich, V. A., P. M. Bennett y M. H. Richmond. 1977. Characterization of a translocation unit encoding resistance to mercuric ions that occurs on a nonconjugative plasmid in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **129(3)**:1227-33.
440. Stapleton, P. D., K. P. Shannon y G. L. French. 1999. Construction and characterization of mutants of the TEM-1 beta-lactamase containing amino acid substitutions associated with both extended-spectrum resistance and resistance to beta-lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43(8)**:1881-1887.
441. Stepanova, M. N., M. Pimkin, A. A. Nikulin, V. K. Kozyreva, E. D. Agapova y M. V. Edelstein. 2008. Convergent *in vivo* and *in vitro* selection of ceftazidime resistance mutations at position 167 of CTX-M-3 beta-

- lactamase in hypermutable *Escherichia coli* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* **52(4)**:1297-301.
442. Stokes, H. W., C. Tomaras, Y. Parsons y R. M. Hall. 1993. The partial 3'-conserved segment duplications in the integrons In6 from pSa and In7 from pDGO100 have a common origin. *Plasmid.* **30(1)**:39-50.
443. Stokes, H. W., C. L. Nesbo, M. Holley, M. I. Bahl, M. R. Gilling y Y. Boucher. 2006. Class 1 integrons potentially predating the association with *tn402*-like transposition genes are present in a sediment microbial community. *J Bacteriol.* **188(16)**:5722-30.
444. Stokes, H. W., L. D. Elbourne y R. M. Hall. 2007. *Tn1403*, a multiple-antibiotic resistance transposon made up of three distinct transposons. *Antimicrob Agents Chemother.* **51(5)**:1827-9.
445. Sturenburg, E., A. Kuhn, D. Mack y R. Laufs. 2004. A novel extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-23 with a P167T substitution in the active-site omega loop associated with ceftazidime resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **54(2)**:406-9.
446. Sundstrom, L., P. H. Roy y O. Skold. 1991. Site-specific insertion of three structural gene cassettes in transposon Tn7. *J Bacteriol.* **173(9)**:3025-8.
447. Szczepanowski, R., I. Krahn, B. Linke, A. Goesmann, A. Puhler y A. Schluter. 2004. Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. *Microbiology.* **150(Pt 11)**:3613-30.
448. Szczepanowski, R., I. Krahn, N. Bohn, A. Puhler y A. Schluter. 2007. Novel macrolide resistance module carried by the IncP-1beta resistance plasmid pRSB111, isolated from a wastewater treatment plant. *Antimicrob Agents Chemother.* **51(2)**:673-8.
449. Szczepanowski, R., S. Braun, V. Riedel, S. Schneiker, I. Krahn, A. Puhler y A. Schluter. 2005. The 120 592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions. *Microbiology.* **151(Pt 4)**:1095-111.
450. Tait, R. C., H. Rempel, R. L. Rodriguez y C. I. Kado. 1985. The aminoglycoside-resistance operon of the plasmid pSa: nucleotide sequence of the streptomycin-spectinomycin resistance gene. *Gene.* **36(1-2)**:97-104.
451. Tartof, S. Y., O. D. Solberg, A. R. Manges y L. W. Riley. 2005. Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.* **43(12)**:5860-4.
452. Tato, M., T. M. Coque, P. Ruiz-Garbajosa, V. Pintado, J. Cobo, H. S. Sader, R. N. Jones, F. Baquero y R. Cantón. 2007. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of *Enterobacteriaceae* infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis.* **45(9)**:1171-8.
453. Tauch, A., A. Schluter, N. Bischoff, A. Goesmann, F. Meyer y A. Puhler. 2003. The 79,370-bp conjugative plasmid pB4 consists of an IncP-1beta backbone loaded with a chromate resistance transposon, the *strA-strB* streptomycin resistance gene pair, the oxacillinase gene *bla(NPS-1)*, and a tripartite antibiotic efflux system of the resistance-nodulation-division family. *Mol Genet Genomics.* **268(5)**:570-84.
454. Taylor, D. E., A. Gribbeel, T. D. Lawley y D. M. Tracz. 2004. Antibiotic resistance plasmids. In: *Plasmid Biology*. Funnell BE, Phillips GJ (eds). American Society for Microbiology, Washington D.C.
455. Tennstedt, T., R. Szczepanowski, I. Krahn, A. Puhler y A. Schluter. 2005. Sequence of the 68,869 bp IncP-1alpha plasmid pTB11 from a waste-water treatment plant reveals a highly conserved backbone, a *Tn402*-like integron and other transposable elements *Plasmid.* **53(3)**:218-38.
456. Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing y B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* **33(9)**:2233-9.
457. Tenover, F. C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control.* **34(5 Suppl 1)**:S3-10; discussion S64-73. Review.
458. Thomas, C. M. 2004. Evolution and population genetics of bacterial plasmids. In: *Plasmid Biology*. Funnell BE, Phillips GJ (eds). American Society for Microbiology, Washington D.C.
459. Thorsted, P. B., D. P. Macartney, P. Akhtar, A. S. Haines, N. Ali, P. Davidson, T. Stafford, M. J. Pocklington, W. Pansegrau, B. M. Wilkins, E. Lanka y C. M. Thomas. 1998. Complete sequence of the IncPbeta plasmid R751: implications for evolution and organisation of the IncP backbone. *J Mol Biol.* **282(5)**:969-90.
460. Toleman, M. A., P. M. Bennett y T. R. Walsh. 2006. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev.* **70(2)**:296-316. Review.

461. Toleman, M. A., D. Biedenbach, D. Bennett, R. N. Jones y T. R. Walsh. 2003. Genetic characterization of a novel metallo-beta-lactamase gene, *bla*<sub>IMP-13</sub>, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother.* **52(4)**:583-90.
462. Toleman, M. A., K. Rolston, R. N. Jones y T. R. Walsh. 2003. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d' beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **47(9)**:2859-63.
463. Toussaint, A. y C. Merlin. 2002. Mobile elements as a combination of functional modules. *Plasmid.* **47(1)**:26-35. Review.
464. Trefault, N., R. De la Iglesia, A. M. Molina, M. Manzano, T. Ledger, D. Pérez-Pantoja, M. A. Sánchez, M. Stuardo y B. González. 2004. Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways. *Environ Microbiol.* **6(7)**:655-68.
465. Tsakris, A., A. Ikonmidis, A. Poulou, N. Spanakis, S. Pournaras y F. Markou. 2007. Transmission in the community of clonal *Proteus mirabilis* carrying VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* **60(1)**:136-9.
466. Tsakris, A., A. Ikonmidis, N. Spanakis, A. Poulou y S. Pournaras. 2007. Characterization of In3Mor, a new integron carrying VIM-1 metallo-beta-lactamase and *satI* gene, from *Morganella morganii*. *J Antimicrob Chemother.* **59(4)**:739-41.
467. Turner, S. M., R. R. Chaudhuri, Z. D. Jiang, H. DuPont, C. Gyles, C. W. Penn, M. J. Pallen y I. R. Henderson. 2006. Phylogenetic comparisons reveal multiple acquisitions of the toxin genes by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of different evolutionary lineages. *J Clin Microbiol.* **44(12)**:4528-36.
468. Tzouveleakis, L. S. y R. A. Bonomo. 1999. SHV-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des.* **5(11)**:847-64. Review.
469. Urban, C., P. A. Bradford, M. Tuckman, S. Segal-Maurer, W. Wehbeh, L. Grenner, R. Colon-Urban, N. Mariano y J. J. Rahal. 2008. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* harboring *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase beta-lactamases associated with long-term care facilities. *Clin Infect Dis.* **46(11)**:e127-30.
470. Valverde, A., R. Cantón, A. Novais, J. C. Galán, F. Baquero, y T. M. Coque. High prevalence of *bla*<sub>CTX-M-14</sub> in Spain is mainly associated with the dissemination of an epidemic plasmid belonging to IncI complex. 18<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2008. Barcelona. Spain.
471. Valverde, A., R. Cantón, J. C. Galán, P. Nordmann, F. Baquero y T. M. Coque. 2006. In117, an unusual Inc0-like class 1 integron containing CR1 and *bla*<sub>CTX-M-2</sub> and associated with a Tn21-like element. *Antimicrob Agents Chemother.* **50(2)**:799-802.
472. Valverde, A., T. M. Coque, L. García-San Miguel, F. Baquero y R. Cantón. 2008. Complex molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: a long-term perspective from a single institution in Madrid. *J Antimicrob Chemother.* **61(1)**:64-72.
473. Valverde, A., T. M. Coque, M. P. Sánchez-Moreno, A. Rollán, F. Baquero y R. Cantón. 2004. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol.* **42(10)**:4769-75.
474. van Belkum, A., M. Struelens, A. de Visser, H. Verbrugh y M. Tibayrenc. 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* **14(3)**:547-60. Review.
475. Verdet, C., G. Arlet, G. Barnaud, P. H. Lagrange y A. Philippon. 2000. A novel integron in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, carrying the *bla*(DHA-1) gene and its regulator gene *ampR*, originated from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother.* **44(1)**:222-5.
476. Villa, L., C. Pezzella, F. Tosini, P. Visca, A. Petrucca y A. Carattoli. 2000. Multiple-antibiotic resistance mediated by structurally related IncL/M plasmids carrying an extended-spectrum beta-lactamase gene and a class 1 integron. *Antimicrob Agents Chemother.* **44(10)**:2911-4.
477. Villegas, M. V., J. N. Kattan, M. G. Quinteros y J. M. Casellas. 2008. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect.* **1**:154-8.
478. Villegas, M. V., K. Lolans, A. Correa, C. J. Suarez, J. A. Lopez, M. Vallejo y J. P. Quinn y Colombian Nosocomial Resistance Study Group. 2006. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother.* **50(8)**:2880-2.
479. Walk, S. T., E. W. Alm, L. M. Calhoun, J. M. Mladonicky y T. S. Whittam. 2007. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environ Microbiol.* **9(9)**:2274-88.



480. Walsh, T. R. 2006. Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Curr Opin Microbiol.* **9(5)**:476-82. Review.
481. Walsh, T. R., M. A. Toleman, L. Poirel y P. Nordmann. 2005. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* **18(2)**:306-25. Review.
482. Walther-Rasmussen, J., y N Hoiby. 2006. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* **57(3)**:373-383.
483. Wang, H., S. Kelkar, W. Wu, M. Chen y J. P. Quinn. 2003. Clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases: prevalence of CTX-M-3 at a hospital in China. *Antimicrob Agents Chemother.* **47(2)**:790-3.
484. Wang, M., J. H. Tran, G. A. Jacoby, Y. Zhang, F. Wang y D. C. Hooper. 2003. Plasmid mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47(7)**:2242-8.
- 484a. Ward D.M., F.M. Cohan, D. Bhaya, J.F. Heidelberg, M. Köhl, A. Grossman. 2008. Genomics, environmental genomics and the issue of microbial species. *Heredity.* **100(2)**:207-19.
485. Watanabe, M., S. Iyobe, M. Inoue y S. Mitsuhashi. 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **35(1)**:147-151.
486. Watanabe, T. y T. Fukasawa. 1960. Episome mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. *J Bacteriol.* **81**:669-78.
487. Weill, F. X., R. Lailler, K. Praud, A. Kerouanton, L. Fabre, A. Brisabois, P. A. Grimont y A. Cloeckart. 2004. Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *J Clin Microbiol.* **42(12)**:5767-73.
488. Weill, F. X., M. Demartin, L. Fabre y P.A. Grimont. 2004. Extended-spectrum-beta-lactamase (TEM-52)-producing strains of *Salmonella enterica* of various serotypes isolated in France. *J Clin Microbiol.* **42(7)**:3359-62.
489. Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier y D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* **173(2)**:697-703.
490. Welch, T. J., W. F. Fricke, P. F. McDermott, D. G. White, M. L. Rosso, D. A. Rasko, M. K. Mammel, M. Eppinger, M. J. Rosovitz, D. Wagner, L. Rahalison, J. E. Leclerc, J. M. Hinshaw, L. E. Lindler, T. A. Cebula, E. Carniel y J. Ravel. 2007. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS ONE.* **2**:e309.
491. Welsh, K. J., M. Barlow, F. C. Tenover, J. W. Biddle, J. K. Rasheed, L. A. Clark y J. E. McGowan Jr. 2005. Experimental prediction of the evolution of ceftazidime resistance in the CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* **49(3)**:1242-4.
492. Whittle, G., N. B. Shoemaker y A. A. Salyers. 2002. The role of *Bacteroides* conjugative transposons in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Cell Mol Life Sci.* **59(12)**:2044-54.
493. Wiener, J., J. P. Quinn, P. A. Bradford, R. V. Goering, C. Nathan, K. Bush, y R. A. Weinstein. 1999. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA.* **281(6)**:517-23.
494. Wilbaux, M., N. Mine, A. M. Guerout, D. Mazel y L. Van Melderren. 2007. Functional interactions between coexisting toxin-antitoxin systems of the ccd family in *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol.* **189(7)**:2712-9.
495. Wirth, T., D. Falush, R. Lan, F. Colles, P. Mensa, L. H. Wieler, H. Karch, P. R. Reeves, M. C. Maiden, H. Ochman y M. Achtman. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol.* **60(5)**:1136-51.
496. Witte, W. 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science.* **279(5353)**:996-7.
497. Wolf, M. K. 2000. Bacterial infections of the small intestine and colon. *Curr Opin Gastroenterol.* **16(1)**:4.
498. Woodford, N., M. E. Kaufmann, E. Karisik y J. W. Hartley. 2007. Molecular epidemiology of multiresistant *Escherichia coli* isolates from community-onset urinary tract infections in Cornwall, England. *J Antimicrob Chemother.* **59(1)**:106-9.
499. Woodford, N. y M. J. Ellington. 2007. The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin Microbiol Infect.* **13(1)**:5-18. Review.
500. Woodford, N., E. J. Fagan y M. J. Ellington. 2006. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* **57(1)**:154-5.
501. Woodford, N., M. E. Ward, M. E. Kaufmann, J. Turton, E. J. Fagan, D. James, A. P. Johnson, R. Pike, M. Warner, T. Cheasty, A. Pearson, S. Harry, J. B. Leach, A. Loughrey, J. A. Lowes, R. E. Warren y D. M. Livermore. 2004. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* **54(4)**:735-43.

502. **Wright, G. D.** 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol.* **5(3)**:175-86. Review.
503. **Xu, Z., L. Shi, C. Zhang, L. Zhang, X. Li, Y. Cao, L. Li y S. Yamasaki.** 2007. Nosocomial infection caused by class 1 integron-carrying *Staphylococcus aureus* in a hospital in South China. *Clin Microbiol Infect.* **13(10)**:980-4.
504. **Yagi, T., H. Kurokawa, K. Senda, S. Ichiyama, H. Ito, S. Ohsuka, K. Shibayama, K. Shimokata, N. Kato, M. Ohta y Y. Arakawa.** 1997. Nosocomial spread of cephem-resistant *Escherichia coli* strains carrying multiple Toho-1-like beta-lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother.* **41(12)**:2606-11.
505. **Yigit, H., A. M. Queenan, G. J. Anderson, A. Domenech-Sanchez, J. W. Biddle, C. D. Steward, S. Alberti, K. Bush y F. C. Tenover.** 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **45(4)**:1151-61. Erratum in: *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Feb;**52(2)**:809.
506. **Yokota, T., R. Kuwahara, S. Hagiwara y S. Kuwahara.** 1977. Cyclic adenylic acid-dependent and -independent production of chloramphenicol acetyltransferase in *Escherichia coli* carrying R plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* **11(6)**:952-5.
507. **Yokoyama, K., Y. Doi, K. Yamane, H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, T. Yagi, H. Kato y Y. Arakawa.** 2003. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet.* **362(9399)**:1888-93.
508. **Yurieva, O., G. Kholodii, L. Minakhin, Z. Gorlenko, E. Kalyaeva, S. Mindlin y V. Nikiforov.** 1997. Intercontinental spread of promiscuous mercury-resistance transposons in environmental bacteria. *Mol Microbiol.* **24(2)**:321-9.
509. **Zienkiewicz, M., I. Kern-Zdanowicz, M. Golebiewski, J. Zylińska, P. Mieczkowski, M. Gniadkowski, J. Bardowski y P. Ceglowski.** 2007. Mosaic structure of p1658/97, a 125-kilobase plasmid harboring an active amplicon with the extended-spectrum beta-lactamase gene *bla<sub>SHV-5</sub>*. *Antimicrob Agents Chemother.* **51(4)**:1164-71.



# Capítulo 7

---

**ANEXOS**



## 7.1. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1.1. Microorganismos

Los microorganismos analizados en esta tesis incluyen aislados clínicos y fecales de *Enterobacteriaceae* productores (n=368) y no productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (n=81) identificados entre 1988 y 2004. Se incluyó un único aislado representativo de cada fenotipo de resistencia para evitar sobre-representación de cepas determinadas debida a la presencia de múltiples aislados de un mismo paciente.

Los microorganismos estudiados fueron divididos en tres grupos atendiendo a la producción de BLEE y el origen de los aislados.

#### 7.1.1.1. Aislados productores de BLEE del Hospital Universitario Ramón y Cajal

Este grupo incluye 310 aislados de *Enterobacteriaceae* productores de BLEE procedentes de muestras clínicas aisladas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal desde su primera identificación en 1988 hasta 2004, identificados como *E. coli* (n=181), *K. pneumoniae* (n=85), *E. cloacae* (n=13), *S. enterica* (n=11), *K. oxytoca* (n=7), *E. aerogenes* (n=7), *C. freundii* (n=4), *Enterobacter gergoviae* (n=1) y *S. marcescens* (n=1). Estos microorganismos fueron aislados de pacientes extrahospitalarios (n=87, 28.5%) y de pacientes hospitalizados (n=218, 71.5%), éstos últimos distribuidos en unidades médicas (n=126, 41.3%), unidades quirúrgicas (n=32, 10.5%) y unidades de cuidados intensivos (n=60, 19.7%). Los aislados estudiados se obtuvieron a partir de muestras de orina (n=145, 46.9%), respiratorias (n=53, 17.1%), de sangre (n=28, 9.1%), de heridas (n=28, 9.1%), de heces (n=28, 9.1%), de catéteres (n=13, 4.2%) y de otros orígenes (n=14, 4.5%). El análisis de todos los aislados productores de BLEE durante un período de tiempo determinado desde su detección inicial permitió analizar la evolución de los genes que codifican BLEE en nuestra institución.

#### 7.1.1.2. Aislados productores de BLEE representativos de otros países

Este grupo incluye los aislados internacionales analizados en los estudios epidemiológicos de microorganismos productores de TEM-24 y CTX-M-15 (ver apartados 3.2.2 y 3.2.3).

- a) TEM-24. Se estudiaron 17 aislados productores de TEM-24 de tres países donde la incidencia de esta BLEE es elevada (Portugal, Francia y Bélgica) correspondientes a 6 *E. aerogenes* (EA); 6 *K. pneumoniae* (KP), 2 *E. coli* (EC), 2 *P. mirabilis* (PM) y 1 *K. oxytoca* (KO). Estos aislados fueron obtenidos de pacientes ingresados en unidades médicas (57%), unidades de cuidados intensivos (28%) y unidades quirúrgicas (14%) y son responsables de brotes epidémicos en los distintos países (48, 117, 268).

- b) CTX-M-15. Se analizaron 41 aislados de *E. coli* productores de CTX-M-15 procedentes de Francia (n=17), Kuwait (n=9), Suiza (n=7), Canadá (n=4), Portugal (n=4), y 6 plásmidos que contienen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> de India, identificados entre 2001 y 2005. Estos aislados son representativos de estas áreas geográficas, bien por haber causado brotes epidémicos, bien por haber sido los primeros que se describen en estos países (219, 238, 239, 240, 268, 366).
- c) CTX-M-3. Se incluyó en el estudio un aislado productor de CTX-M-3 de Polonia, donde esta  $\beta$ -lactamasa se encuentra ampliamente distribuida en aislados clínicos de enterobacterias de ese país y cuya diseminación ha sido recientemente asociada a un plásmido conjugativo de tipo IncL/M (19, 134)

#### 7.1.1.3. Aislados no-productores de BLEE de origen clínico y comunitario

Como grupo control, se analizó una colección de aislados de *E. coli* no-productores de BLEE (n-BLEE) de origen clínico (C-BLEE) y comunitario (V-BLEE): i) C-nBLEE (n=43), aislados responsables de bacteriemias en pacientes de este hospital en el mismo periodo de tiempo, localizados en unidades quirúrgicas (39.5%), unidades médicas (18.6%), unidades de cuidados intensivos (16.3%) y urgencias (25.6%); ii) V-nBLEE (n=38), aislados de heces de voluntarios sanos residentes en Madrid (obtenidos en 2001) sin contacto previo con el hospital y sin antibióticos en los tres meses previos a la toma de la muestra.

#### 7.1.2. **Medios y condiciones de cultivo**

Se utilizaron medios de cultivo selectivos y no selectivos para el aislamiento y crecimiento de aislados de *Enterobacteriaceae*.

El medio Luria-Bertani Agar (LB) o Caldo de Luria-Bertani (Laboratorios Conda S.A., Madrid, España), que consiste en un medio nutritivo no selectivo y no diferencial fue el empleado rutinariamente para el crecimiento bacteriano tanto en medio sólido como en medio líquido. El medio sólido de MacConkey, medio selectivo diferencial que permite distinguir bacterias Gram negativas fermentadoras y no fermentadoras de lactosa, fue utilizado para el aislamiento de enterobacterias de muestras clínicas y muestras fecales de individuos sanos. La adición de cefotaxima o ceftazidima a la concentración de 1  $\mu$ g/ml permitió el aislamiento de enterobacterias productoras de BLEE de las distintas muestras. El medio de Muller-Hinton (MH) Agar o Caldo de Muller-Hinton (Oxoid Lda., Basingstoke, Hampshire, RU), medio no selectivo y no diferencial suplementado con los iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), fue utilizado para la realización de pruebas de sensibilidad a antibióticos por diferentes métodos siguiendo las normas de *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) (86).

Todos los inóculos realizados en estos medios de cultivo fueron incubados en aerobiosis en estufa o baño a 37°C, durante 8-24 horas.

### 7.1.3. Identificación de las especies bacterianas

La identificación bacteriana fue realizada utilizando los sistemas automáticos comerciales PASCO (Difco, Detroit, MI) y WIDER (Fco. Soria Melguizo, Madrid, España), y paneles para microorganismos Gram negativos (MIC/ID, Fco. Soria Melguizo, Madrid, España).

### 7.1.4. Estudios de sensibilidad a agentes antimicrobianos

Las pruebas de sensibilidad o antibiograma definen la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado e indican la concentración necesaria para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. La determinación de sensibilidad a diferentes agentes antimicrobianos de la colección de microorganismos estudiada se realizó por métodos de difusión en agar (disco-placa), métodos de dilución (microdilución en caldo) o por Épsilon-test (E-test). Las placas inoculadas se incubaron a 37°C durante 16-20h.

#### 7.1.4.1. Agentes antimicrobianos

Se determinó la sensibilidad de aquellos antibióticos con actividad frente a microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* que permiten inferir la producción de BLEE (cefalosporinas de tercera generación), que son frecuentemente usados en la práctica clínica (quinolonas, aminoglucósidos, ciprofloxacino) o aquellos cuya resistencia está asociada a la presencia de integrones o transposones muy diseminados a pesar de su uso infrecuente en la práctica clínica (estreptomina, cloranfenicol, sulfamida, trimetoprim, y tetraciclina).

La sensibilidad a distintos *antibióticos β-lactámicos* fue evaluada utilizando los siguientes rangos de concentración: cefotaxima (0.125-256µg/ml), ceftazidima (0.06-128µg/ml), aztreonam (0.06-128µg/ml), cefuroxima (0.125-256µg/ml), cefepima (0.06-128µg/ml) y amoxicilina-ácido clavulánico (0.03/0.015-64-32 µg/ml). Para las pruebas de sinergia entre distintos agentes β-lactámicos (ver apartado 7.1.7.1), se utilizaron discos de cefotaxima (30µg), ceftazidima (30µg), y una combinación de amoxicilina y ácido clavulánico en proporción 2:1 (20 µg/10 µg).

La sensibilidad a *antibióticos no-β-lactámicos* fue determinada por la técnica de Kirby-Bauer siendo la concentración de los discos para cada uno de los antibióticos la siguiente: ácido nalidíxico (30µg), amikacina (30µg), apramicina (15µg), ciprofloxacino (5µg), cloranfenicol (30µg), espectinomicina (10µg), estreptomina (10µg), gentamicina (10µg), kanamicina (30µg), neomicina (30µg), netilmicina (30µg), nitrofurantoína (300 µg), sulfamida (300µg),



tetraciclina (35µg), tobramicina (10µg) y trimetoprim (5µg) (Oxoid Lda., Basingstoke, Hampshire, RU).

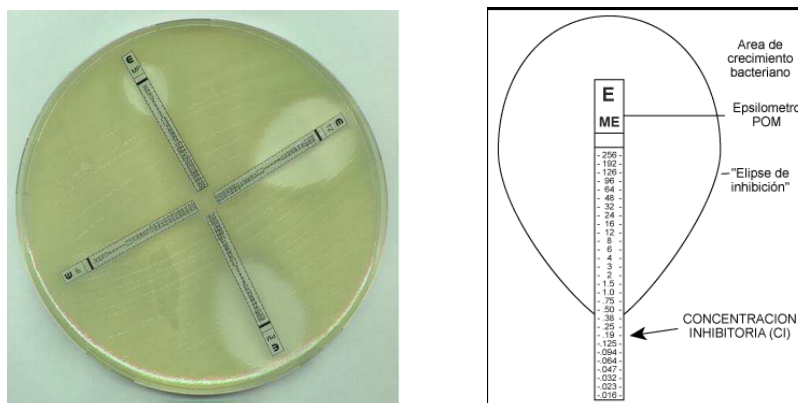
#### 7.1.4.2. Técnicas utilizadas

La sensibilidad a agentes antimicrobianos se determinó preliminarmente utilizando los *sistemas semiautomáticos comerciales de microdilución* PASCO (Difco, Detroit, MI) y WIDER (Fco. Soria Melguizo, Madrid, España). Los resultados obtenidos con estos sistemas fueron confirmados por los métodos estándar de análisis de sensibilidad a antibióticos de *microdilución en caldo* y *difusión en disco-placa* siguiendo las recomendaciones del (CLSI) o *por tiras de E-test* (AB BIODISK, Solna, Suecia). Las cepas control utilizadas para validación del método y que presentan valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) conocidos fueron *E. coli* ATCC25922 (sensible) para ceftazidima (0.06-0.5µg/ml), cefotaxima (0.03-0.12µg/ml), cefepima (0.015-0.12µg/ml) y cefuroxima (2-8µg/ml), y *E. coli* ATCC35218 (posee una β-lactamasa) para amoxicilina/ácido clavulanico (16/8-4/2µg/ml).

- a) Microdilución en caldo. Es uno de los métodos de referencia para la determinación cuantitativa de la CMI a un determinado antibiótico y consiste en la determinación visual del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes de antibiótico (85). El inóculo se preparó a partir de suspensiones 0.5 en la escala de McFarland (equivalente a  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml) que fue diluido 1:100 en caldo de Muller-Hinton para alcanzar una concentración final de  $5 \times 10^5$  UFC/ml ó  $5 \times 10^4$  UFC/pocillo. El inóculo ya diluido fue utilizado en los 15 minutos posteriores a su preparación. Se emplearon placas de 96 pocillos (12x8) que permiten evaluar 12 concentraciones de 6 antibióticos dejando las dos filas finales como controles de crecimiento positivo (sin antibiótico) y negativo (sin inóculo). El volumen final de cada pocillo fue de 100 µl correspondiente a caldo con antimicrobiano (50 µl) y caldo con cultivo bacteriano (50 µl). Las placas se prepararon utilizando una pipeta multicanal y añadiendo 100µl de la solución de agente antimicrobiano más concentrada en la columna 1 y un volumen de 50µl de caldo sin antibiótico en los pocillos de las columnas 2 a 12. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de 50 µl de las columnas 1 a 12 empleando una pipeta multicanal. Los pocillos de la fila 7 corresponden a controles de crecimiento positivo (sin antibiótico). Finalmente se añadió 50 µl de cultivo a todos los pocillos con excepción de la fila 8, que funcionó como control de crecimiento negativo. Las placas se incubaron en torres no superiores a 4-5 placas para evitar diferencias de temperatura en la incubación. La CMI se definió como la menor concentración de antimicrobiano que

inhibe completamente el crecimiento del microorganismo estudiado, el cual se visualiza como una clara turbidez o un botón.

- b) Difusión en disco-placa. Se trata de una técnica de sensibilidad semicuantitativa basada en los trabajos de Kirby y Bauer, que utiliza discos de papel impregnados de antibiótico a una concentración determinada que son depositados en una placa inoculada con una suspensión bacteriana 0.5 McFarland en suero fisiológico (equivalente a  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml). El diámetro del halo de inhibición de crecimiento (en mm) permite valorar la sensibilidad de un determinado microorganismo frente a cada antibiótico en las categorías de sensibilidad (S), sensibilidad intermedia (I) o resistencia (R) siguiendo las normas establecidas por el CLSI (85). El diámetro obtenido en la zona de inhibición se correlaciona con los valores de CMI determinados a partir de técnicas estándar.
- c) Tiras de Epsilon-test (E-test). Se trata de una técnica para determinación cuantitativa de la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) que utiliza una tira de plástico impregnada de antibiótico a un rango de concentración creciente y variable según el agente antimicrobiano a evaluar y que se deposita en una placa inoculada con una suspensión bacteriana 0.5 en la escala de McFarland en suero fisiológico. La CMI corresponde al valor que aparece en el punto de intersección del halo de inhibición de crecimiento bacteriano de forma elipsoidal (de ahí el nombre de la técnica) con la tira (ver figura 19). Este procedimiento se realizó siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (AB BIODISK, Solna, Suecia).



**Figura 19.** Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos por E-test.

### 7.1.5. Técnicas moleculares

#### 7.1.5.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico o plasmídico fue realizada por técnicas de extracción convencionales o utilizando kits comerciales. Las técnicas de extracción convencionales utilizan como agentes líticos el calor, soluciones alcalinas y/o detergentes. Los kits comerciales combinan los procedimientos anteriores con el uso de columnas específicas de purificación de ADN genómico o plasmídico. Estos métodos permiten obtener ADN con elevada pureza, mayor rendimiento y estabilidad aunque a un coste significativamente superior a los convencionales.

- a) ADN genómico. Se realizó por la técnica de extracción por calor (*boiling*) o utilizando columnas específicas de sílice-gel de los *kits comerciales* DNeasy Tissue kit® (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) o Wizard Genomic DNA purification System (Promega, Madison, WI). En el primer caso, se obtuvo el ADN a partir del sobrenadante de una suspensión bacteriana en 300 µl de agua hervida a 100°C durante 15 minutos y centrifugada a 13.000 rpm durante 15 minutos. La obtención de ADN utilizando kits comerciales se realizó a partir de una suspensión bacteriana de las células recuperadas de un cultivo bacteriano líquido (en caldo LB) en un tampón de lisis, y un tratamiento de la muestra con proteinasa K (20mg/ml). El sobrenadante obtenido tras centrifugación se pasó por una columna de sílice a la que el ADN se adsorbe específicamente. Finalmente, se realiza el lavado de los contaminantes existentes (proteínas o inhibidores enzimáticos) y la elución del ADN purificado a través de una solución de bajo contenido en sales o en agua.

La extracción de ADN genómico *in situ* se realizó por incorporación de las células bacterianas en moldes de agarosa siguiendo el protocolo estándar original de Cold Spring Harbour y, ocasionalmente, un protocolo de preparación rápido (159, 434a). Resumidamente, se inocula una colonia en caldo LB y se incuba el cultivo bacteriano a 37°C durante 18h. Se centrifugan los tubos de cultivo a 6.000 rpm., y se lavan las células con una solución de PIV (10mM Tris-HCl pH7.6 + 1M NaCl). A esta suspensión de células se le añade un volumen de agarosa al 1.6% (agarosa D-5, Laboratorios Conda S.A., Madrid, España) en proporción 1:1 con el cuidado de lograr una mezcla homogénea que se dispensará en moldes apropiados. Tras la solidificación de los bloques de agarosa a temperatura ambiente durante 15-20 min, se procede a la lisis de las células contenidas en los mismos utilizando una solución de 6mM Tris-HCl (pH7.6), 1M NaCl, 100mM EDTA (pH7.5), 0.5% Brij58, 0.2% desoxicolato, 0.5% de lauroil sarcosina de sodio (Sarcosyl), 20µg/ml ARNasa y 1mg/ml de lisozima durante

18h. La desproteinización se lleva a cabo con una solución (ESP), compuesta por 0.5M EDTA (pH9.0), 1% Sarkosyl y 50µg/ml de proteinasa K (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA) en baño a 50°C durante 18h. Por último, se realizan 3-4 lavados de los bloques de agarosa con una solución de TE a temperatura ambiente con agitación durante 5-15 min. En el protocolo rápido, los pasos de lisis y desproteinización ocurren simultáneamente, utilizando una solución de 50mM Tris, 50mM EDTA, 1% N-laurylsarkosine y 0.1mg/ml proteinasa K, pH=8 (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA) durante un período de incubación de 18h a 54°C.

- b) *ADN plasmídico*. La obtención de plásmidos se llevó a cabo utilizando los *métodos de lisis alcalina de Birnboim y Doly* (plásmidos de 2-150kb) y el *método de Barton* (plásmidos 30->150kb).

El *método de lisis alcalina de Birnboim y Doly* se basa en la diferente resistencia del ADN plasmídico y del ADN cromosómico al pH básico (40). La utilización de una solución de hidróxido de sodio 0.2N y del detergente dodecil sulfato de sodio al 1% (SDS) provoca la lisis celular y la desnaturalización del ADN plasmídico y cromosómico. La neutralización posterior con acetato potásico (3M, pH=5) permite que el ADN plasmídico vuelva a su configuración covalente circular cerrada y que por lo tanto permanezca soluble, mientras el ADN cromosómico y las proteínas precipitan en un complejo formado por potasio y SDS que se elimina por centrifugación. El ADN presente en el sobrenadante se purifica con una solución de fenol:cloroformo:álcohol isoamílico (25:24:1) y con una solución de cloroformo. A continuación, el ADN se recupera tras una primera precipitación del sobrenadante obtenido con etanol adicionado de acetato potásico (1:10) durante 30-90 minutos y posteriormente se concentra por precipitación con etanol al 70%, repitiendo este paso dos veces. Este método ha estado tradicionalmente limitado a la extracción de plásmidos en alto o medio número de copias y de peso molecular <50kb, obteniéndose un rendimiento aproximado de 2-5µg de ADN. Las versiones comerciales del método de lisis alcalina utilizan volúmenes mayores y un paso de purificación posterior con resinas de intercambio iónico, permitiendo un rendimiento de 100-150 µg de ADN. En esta tesis se utilizaron los kits QIAprep Spin Miniprep kit, el QIAGEN Plasmid Midi kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) y el PowerPrep™ HP Midiprep Kits with Prefilters (Marlingen Biosciences, Ijamsville, Maryland, EUA), que permiten la extracción de varias muestras en un día de trabajo y la obtención de plásmidos de bajo número de copias y de alto peso molecular (hasta 150 kb).

El *método de Barton* consiste en el análisis de ADN genómico por electroforesis de campo pulsado tras digestión con S1 nucleasa y está basado en la digestión selectiva de la enzima utilizada que digiere totalmente el ADN cromosómico y convierte el ADN plasmídico super

enrollado en ADN lineal, permitiendo que su migración en un gel de campo pulsado sea directamente proporcional a su tamaño y comparable con los marcadores de peso molecular utilizados (24).

#### 7.1.5.2. Digestión de ADN

La digestión de ADN genómico, plasmídico o correspondiente a fragmentos obtenidos tras amplificación selectiva por PCR se realizó utilizando enzimas de restricción cuyo tipo y concentración fue variable según el ADN a analizar y los objetivos planteados (*obtención de patrones de huella dactilar, fragmentos para clonar o verificación de insertos*, véase apartados 7.1.9.2, 7.1.9.3 y 7.1.10.1). Las condiciones de reacción se establecieron siguiendo las recomendaciones del fabricante con un tiempo de incubación de 4-18h a la temperatura óptima para cada enzima. Tras la digestión, las enzimas se inactivaron a 65°C durante 15-20 minutos.

La digestión del ADN genómico *in situ* (en moldes de agarosa) con enzimas de restricción apropiadas se llevó a cabo tras un lavado previo de una porción de un bloque de agarosa (3mm de ancho) con agua durante 10 minutos. La digestión enzimática se realizó en un volumen final de reacción de 100µl (1X del tampón de reacción específico de la enzima elegida, y 6-30U de enzima), a 37°C durante un tiempo variable (30 min-24 horas).

#### 7.1.5.3. Amplificación de ADN

##### a) PCR

La técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction o reacción en cadena por la polimerasa) se utilizó para la *detección e identificación de secuencias* (apartado 7.1.7.4), la *tipificación molecular de integrones* (apartado 7.1.9.3) y la *obtención de fragmentos para clonación posterior* (apartado 7.1.10.1).

Todas las reacciones de PCR se realizaron en termocicladores MJ Research PTC-100 (Global Medical Instrumentation Inc., Minnesota, EUA) utilizando controles de reacción positivo, negativo y blanco. Las condiciones y componentes de cada reacción variaron dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar.

Para la **amplificación de secuencias de ADN < 3 kb** se prepararon mezclas en un volumen de reacción final de 50µl o 20µl que contenían los siguientes componentes a la concentración final que se especifica entre paréntesis: tampón de reacción (1X), MgCl<sub>2</sub> (1.5mM), dideoxinucleótidos (0.2 mM), cebadores específicos directo y reverso (1µM) y Taq polimerasa (1.5UI). Las condiciones de reacción utilizadas fueron un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 10 min, 35 ciclos de amplificación a 94°C durante 1 min, alineamiento a 50-65°C durante 1-2 min y extensión a 72°C durante 1-3 min, seguido de un paso de extensión final a

72°C durante 10 min. Las polimerasas utilizadas fueron *Amplitaq Gold* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), *EcoTaq* (Ecogen, Madrid, España) y *rTaq* (Takara Bio Inc, Shiga, Japón). La enzima *Amplitaq Gold* es una polimerasa de alta fidelidad y especificidad que se activa solamente a temperaturas elevadas (“hot-start”), disminuyendo por tanto la formación de productos inespecíficos y aumentando el rendimiento. Las enzimas *EcoTaq* (Ecogen, Madrid, España) y *rTaq* (Takara Bio Inc, Shiga, Japón) son polimerasas sin requerimientos especiales y compatibles con una gran variedad de reacciones de PCR.

Para la **amplificación de secuencias >3kb** se utilizaron mezclas en un volumen final de reacción de 50µl o 20µl que contenían los siguientes componentes a la concentración final que se especifica entre paréntesis: tampón de reacción (2.5mM), MgCl<sub>2</sub> (2.5mM), cebadores específicos directo y reverso (1µM) y *Taq* polimerasa (2.5UI). La polimerasa utilizada fue *Takara LA Taq<sup>TM</sup>* (Takara Bio Inc, Shiga, Japón), una enzima de alta eficiencia y fidelidad que permite la amplificación de fragmentos de ADN >15 kb. Las condiciones de reacción utilizadas fueron: un ciclo de desnaturalización a 94°C (1 min), 35 ciclos a 96°C (20s), 55-60°C (1 min) y 72°C (3-5 min), seguidos de un paso final de 10 min a 72°C.

La adición ocasional de dimetilsulfóxido (DMSO) (5-10%), un agente desnaturalizante que permite una mejor separación de las cadenas de ADN, facilitó la amplificación de fragmentos grandes y su posterior secuenciación ya que reduce la formación de productos inespecíficos que se generan durante la amplificación.

Los cebadores y las condiciones de todas las reacciones de PCR aplicadas en esta tesis son descritos en la tabla 12.

La purificación de productos de PCR obtenidos, necesaria antes de proceder a su digestión enzimática, secuenciación o clonación, se realizó utilizando el kit comercial QIAquick PCR® (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) que permite la adsorción del ADN a una membrana de sílice en presencia de altas concentraciones de sales y su posterior elución con agua o un tampón específico con bajo contenido en sales.

#### 7.1.5.4. Separación de ADN

La separación de fragmentos ADN se realizó por electroforesis utilizando sistemas de corriente continua y corriente alterna.

##### a) Electroforesis de corriente continua.

Este tipo de electroforesis consiste en la aplicación de un campo eléctrico estático de corriente continua, que permite separar fragmentos de ADN de tamaño comprendido entre 10pb y 50 kb que migran en el gel en función de su peso molecular. Sin embargo, la resolución de los

fragmentos superiores a 20kb es baja, dado que migran simultáneamente bajo las condiciones aplicadas. Esta técnica ha sido utilizada para la separación de productos de PCR (con tamaños aproximados de entre 0.2-10kb) o para la separación de plásmidos digeridos o sin digerir.

En los pocillos del gel se aplica una cantidad de muestra de ADN (2-3µl para productos de PCR o 15-20µl para plásmidos), mezclada previamente con una cantidad de entre 2-5µl de tampón de carga, cuya función es monitorizar el proceso electroforético y proporcionar densidad a la mezcla aplicada. La separación de los fragmentos de ADN se realiza en una cubeta de electroforesis con tampón TBE 0.5X, utilizando una corriente eléctrica entre 80 y 100V durante 40 min-4 o 5 horas. La duración de la corrida es directamente proporcional a la concentración de agarosa utilizada y termina cuando el frente visible por la presencia del tampón de carga migre hasta el final del gel. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron  $\lambda$ -EcoT14 I/Bgl II digest (0.06-22.01 kb) y 100 bp DNA ladder (100-1000 pb) (Takara Bio Inc., Shiga, Japón).

b) Electroforesis de corriente alterna o electroforesis de campo pulsado (ECP)

El procedimiento incluye la *extracción de ADN* en bloques de agarosa (ver apartado 7.1.5.1), *digestión de ADN* con enzimas de restricción que reconocen secuencias de 6-8 pb (ver apartado 7.1.5.2), y *separación de los fragmentos* obtenidos por electroforesis utilizando un gradiente de corriente alterna que permite la resolución de moléculas de alto peso molecular (>20kb). Los cambios de dirección en el campo eléctrico permiten la reorientación y migración selectiva de moléculas según su peso molecular, posibilitando la separación de moléculas de hasta 10Mb (224, 422).

La *separación de los fragmentos de ADN* obtenidos tras digestión enzimática se efectúa utilizando un sistema CHEF-DRIII (countour-clamped homogeneous electric field) (Bio-Rad Laboratories S.A., La Jolla, CA), aplicando un voltaje de 6V/cm, manteniendo la temperatura a 14°C y utilizando condiciones de corrida variables de acuerdo con el tamaño de los fragmentos generados tras digestión enzimática específica: *XbaI* (10-40s, 24h), *I-CeuI* (5-25s durante 23 h seguido de una rampa de 60-120s durante 10 h) y *S1* nucleasa (5-25s por 6h, seguido de otra rampa de 30-45s por 18h). Los marcadores de peso molecular utilizados fueron  $\lambda$ -ladder PFG marker (48kb-1018.5kb), Low Range PFG marker (0.13-194 kb) y el Yeast Chromosome PFG marker (225-1900 kb), todos ellos de la casa comercial New England Biolabs (New England Biolabs, Inc., Ipswich, EUA).

c) Preparación de geles de agarosa

*Para electroforesis corriente continua.* Los geles se prepararon en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X, a una concentración de agarosa variable dependiendo del tamaño molecular de los fragmentos a separar. La agarosa utilizada fue *agarosa D-1* (Laboratorios Conda S.A., Madrid, España) que se caracteriza por su baja endoelectrosmosis permitiendo una alta movilidad electroforética. Por norma general, se usaron geles de agarosa al 0.7-0.8% (peso/volumen) para la separación de fragmentos entre 0.5 y 20 kb, geles de agarosa al 1% para la separación de fragmentos entre 0.3 y 10 kb y geles de agarosa al 2% para la separación de los fragmentos entre 0.1 y 1.0 kb.

*Para electroforesis de campo pulsado.* Los geles se prepararon en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X, a una concentración de agarosa variable (1,2-1,4%) dependiendo del tamaño molecular de los fragmentos a separar. Se utilizó *agarosa D-5* (Laboratorios Conda S.A., Madrid, España) o *agarosa Seakem® Gold* (Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland Maine, EUA), cuyas características (“high gel strenght”, alta movilidad electroforética, “higher exclusión limit”) posibilitan una separación óptima de fragmentos de ADN de gran tamaño por electroforesis de campo pulsado, ya que su bajo valor de electroendosmosis (<0.05) permite una mayor movilidad electroforética, y son adecuadas para la posterior trasferencia de ADN a membranas específicas.

d) Tinción y visualización

La visualización del ADN separado por electroforesis se realiza mediante la tinción de los geles con una solución stock de 1mg/mL de bromuro de etidio (BrEt) durante 30-40 minutos para conseguir una concentración final de 0.2 µg/ml. El BrEt es un colorante fluorescente que se intercala en las bases de la doble hélice del ADN formando un complejo que es detectado a la luz UV. Los geles de agarosa pueden prepararse con y sin BrEt ya que el efecto de este agente sobre la migración del ADN lineal es inapreciable. Sin embargo, no se incorpora nunca a los geles cuando se analizan formas covalentes circulares (CCC) de plásmidos o fragmentos de alto peso molecular ya que las moléculas intercaladas con BrEt son sensibles a la rotura con la luz UV. Los geles son teñidos posteriormente y lavados en agua destilada (10-15 minutos), expuestos a la luz UV y la imagen correspondiente capturada por el equipo Kodak Digital 1D (versión 3.6).

7.1.5.5. Clonación de ADN

El estudio de la evolución de los distintos genes *bla<sub>CTX-M</sub>* fue realizado con plásmidos recombinantes obtenidos tras la clonación de los genes *bla<sub>CTX-M</sub>* en el plásmido pBGS18 (Amp<sup>S</sup>, Kan<sup>R</sup>), un derivado de pBR322 (438) y su posterior transformación en estirpes normo e



hipermutadoras de *E. coli*. El procedimiento consta de 4 etapas: *amplificación de ADN*, *ligación*, *transformación* y *selección*.

*Amplificación de ADN.* Se realizó utilizando oligonucleótidos que incluyen secuencias correspondientes a los puntos de corte (subrayados) de las enzimas seleccionadas para la digestión, y ligación del gen y del plásmido vector de clonación: CTX-MEco (5'-GGAATTCGACTATTCATGTTGTTGTTATT-3'), el cual reconoce una secuencia homóloga a 29 bp del codón de iniciación del gen *bla*<sub>CTX-M</sub> y CTX-MPst (5'-AACTGCAGTTCCGC TATTACAAACCGT-3'), el cual incluye el codón *stop* del mismo gen, permitiendo así la amplificación de la secuencia completa de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>. Las condiciones de amplificación y los métodos de purificación empleados están incluidos en el apartado 7.1.5.3.

*Ligación.* El ADN de los productos de PCR obtenidos y del plásmido pBGS18 fue digerido simultáneamente con *EcoRI* y *PstI*, y posteriormente ligados con la enzima T4 DNA ligasa (Roche Diagnostics S.L., Barcelona, España). La reacción de ligación se efectuó utilizando ADN de plásmido y de inserto a una proporción de 1:3, tampón de reacción de la enzima (1X) y 1UI de T4 DNA ligasa, incubándose la mezcla en baño a 16°C durante 2h o a 4°C durante 18h.

*Transformación.* Los plásmidos recombinantes obtenidos en el paso anterior fueron introducidos en dos tipos de *estirpes receptoras* curadas de plásmidos: *E. coli* MI144 ( $\Delta AmpC$ ), una cepa normomutadora cuyo gen *ampC* se encuentra deletado (92) y *E. coli* GB20 ( $\Delta AmpC$ , *mutS::Tn10*), una estirpe hipermutadora derivada de la anterior caracterizada por la presencia de una mutación en el gen *mutS* (150). El procedimiento de transformación utilizado es descrito en el apartado 7.1.8.2.

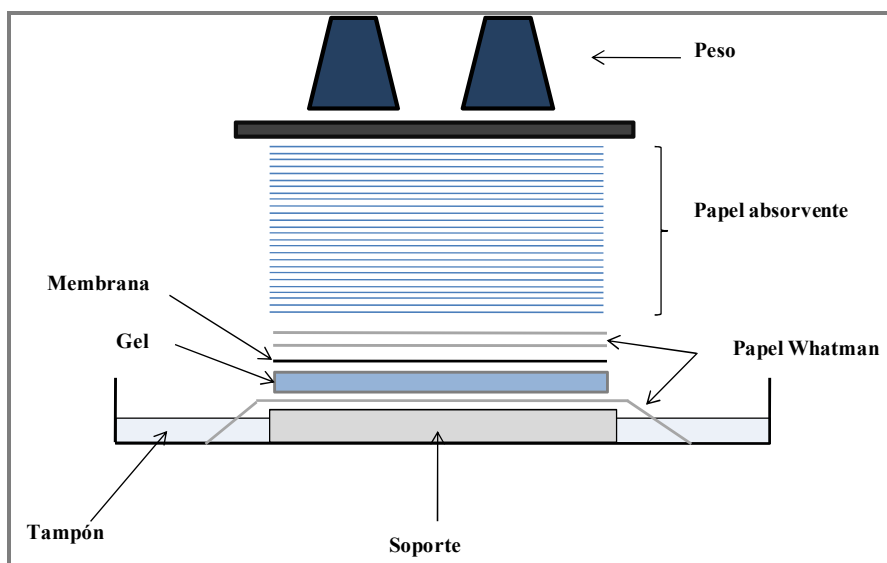
*Selección de los transformantes.* Se realizó en placas de medio de LB suplementadas con kanamicina (50 µg/ml) como marcador del plásmido seleccionado, cefotaxima (1-8 µg/ml), ceftazidima (1-8 µg/ml) o ampicilina (20 µg/ml) como marcador del gen clonado y tetraciclina (20 µg/ml) como marcador de la presencia de *Tn10*.

#### 7.1.5.6. Identificación y tipaje

##### a) Hibridación

La identificación de genes o secuencias en genomas y elementos de transferencia horizontal (plásmidos, transposones) se realizó por hibridación del ADN objeto de estudio con sondas específicas, normalmente obtenidas por PCR. Este proceso comprende las etapas de *separación*, *transferencia* y *fijación del ADN* a una membrana, el *marcaje de sondas*, la *hibridación* del ADN con las mismas, y el *revelado* de la señal obtenida (414).

*Separación, transferencia y fijación del ADN a una membrana.* La separación de los fragmentos de ADN digerido enzimáticamente se efectuó por electroforesis normal o de campo pulsado en las condiciones descritas en el apartado 7.1.5.4. Tras la visualización del gel, se procedió a la fijación del ADN por exposición a la luz UV durante 2 minutos. A continuación, se cubrió el gel con una solución de NaOH 0.4N a temperatura ambiente durante 1.5h, solución que facilita la posterior *transferencia del ADN* a una membrana de nylon por *southern blot* y la eliminación de ARN residual. El sistema para la transferencia de ADN por capilaridad aparece representado en el esquema de la figura 20. Brevemente, el procedimiento consiste en la colocación de una hoja de papel de filtro Whatman 3MM humedecida con NaOH 0.4N sobre un soporte sólido dejando los extremos del papel sumergidos en el líquido de transferencia (NaOH 0.4N). Sobre el papel Whatman, se deposita el gel con los pocillos hacia abajo y sobre éste, una membrana de nylon (Hybond+, Amersham Life Sciences, Uppsala, Sweden) de tamaño exactamente igual al del gel, debidamente marcada y evitando la formación de burbujas de aire. Sobre esta membrana se colocan dos hojas de papel Whatman de igual tamaño, una pila de papeles de filtro de tamaño aproximadamente igual al del gel y sobre todo ello, un peso de aproximadamente 1kg, para facilitar la transferencia del ADN cargado negativamente hacia la membrana que está cargada positivamente. El tiempo para lograr la transferencia varía de 36-72h dependiendo del tamaño de los fragmentos a transferir (36h hasta 20kb, 48-72h para fragmentos >50kb). A continuación se lava la membrana con una solución tampón Tris 0.5M pH=7 durante 5 minutos, una solución de SSC 2% durante 2 minutos y se deja secar sobre papel de filtro. La fijación del ADN transferido a la membrana se realiza por exposición a la luz UV durante 2-3 minutos.



**Figura 20.** Esquema representativo de un sistema de transferencia de ADN por *Southern blot*.

El marcaje de las sondas e hibridación del ADN problema con las mismas se realizó utilizando el kit comercial Gene Images Alkphos Direct Labelling system (Amersham Life Sciences, Uppsala, Sweden) que se basa en una reacción de quimioluminiscencia.

Para el *marcaje directo de las sondas* se utilizó ADN purificado a una concentración de 10 ng/μl que es desnaturalizado por calor (baño a 100°C por 5 minutos) y unido covalentemente a una enzima termoestable (fosfatasa alcalina) tras una incubación a 37°C por 30 minutos.

La *hibridación del ADN fijado en las membranas* con las sondas preparadas requiere un paso previo de pre-hibridación con el líquido de hibridación con el objetivo de “bloquear” la membrana con un ADN extraño y reducir la formación de ligaciones inespecíficas entre el ADN y la membrana. Se añade la sonda previamente marcada al líquido de hibridación y se incuba a 55-60°C durante 18h en horno de hibridación. Posteriormente se procede al lavado de las membranas a 55-60°C (la temperatura depende de las condiciones de astringencia requeridas), para eliminar el exceso de sonda.

La *señal de hibridación* se produce tras la adicción del sustrato dioxetano (CDP-star Detection Reagent; Amersham Life Sciences, Uppsala, Sweden) sobre el que actúa la fosfatasa alcalina emitiendo una señal de luminiscencia. Esta señal se detectó en placas de autoradiografía Hyperfilm-ECL (Amersham Life Sciences, Uppsala, Sweden) tras un período de exposición de 4h-1día en oscuridad a 4°C, utilizando máquinas automáticas de revelado. Las membranas fueron utilizadas varias veces siendo necesario eliminar las sondas fijadas previamente antes de cada nueva hibridación (“*stripping*”). Este proceso se llevó a cabo lavando en una solución desnaturalizante de SDS al 1% a 80°C durante 20 minutos con agitación y en una solución de EDTA 20mM pH=8 por 15 minutos a temperatura ambiente que permite eliminar el ADN de la sonda liberada. El proceso fue repetido dos veces comprobándose la eliminación de la sonda tras exposición de las membranas en placas de autoradiografía y confirmación de una señal negativa.

#### b) Multi-Locus Sequence Typing (MLST)

Esta técnica se basa en el análisis de secuencias intragénicas de ADN correspondientes a 7 genes que codifican enzimas metabólicos no sometidos a presión selectiva (genes “*housekeeping*”) cuyos perfiles permiten detectar variantes alélicas que definen líneas clonales relativamente estables. Los siete genes considerados en el análisis de la especie *E. coli* por MLST son: *adk* (gen que codifica adenilato kinasa), *fumC* (gen que codifica fumarato kinasa), *gyrB* (gen que codifica ADN girasa), *icd* (gen que codifica isocitrato/isopropilmalato deshidrogenasa), *mdh* (gen que codifica malato deshidrogenasa), *purA* (gen que codifica adenilosuccinato deshidrogenasa), y *recA* (gen que codifica ATP/GTP “binding motif”) cuya secuencia, oligonucleótidos y condiciones de amplificación aparecen en la base de datos de la

página web <http://www.mlst.net>. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit QIAquick PCR® (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) y secuenciados posteriormente con el secuenciador automático ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Los cromatogramas obtenidos fueron analizados utilizando el software Chromas Versión 2.32 (Technelysium Pty Lda., Tewantin, Australia) y las secuencias de cada uno de los *loci* comparadas con las identificadas en la base de datos centralizada ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)). Se asignó a cada aislado un perfil de siete números que indica las variantes alélicas de los genes analizados y que se corresponde con un tipo de secuencia (Sequence Type, ST).

#### 7.1.5.7. Análisis bioinformático

Las *secuencias* obtenidas fueron analizadas y editadas utilizando el programa Chromas versión 2.32, y posteriormente comparadas con las disponibles en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y del European Molecular Biology Laboratory (EMBL), utilizando las herramientas BLASTN o BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). El análisis de la similitud entre múltiples secuencias genéticas se realizó con el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). La identificación de ORFs (*open reading frames*) y la anotación de secuencias para depósito en las bases de datos del NCBI se llevó a cabo utilizando el programa ARTEMIS (versión 10.1) y (<http://www.sanger.ac.uk/Software>).

Las imágenes de los *patrones de huella dactilar de ADN genómico y plasmídico* fueron captadas y digitalizadas utilizando el equipo Kodak Digital 1D (versión 3.6) y posteriormente analizadas con el programa BioNumerics (version 4.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). La relación entre patrones de bandas se calculó aplicando el coeficiente de similitud de Dice, generándose un dendrograma a partir del algoritmo de medias aritméticas de UPGMA.

#### 7.1.6. Estructura poblacional de *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE

La identificación de *clones* o *grupos clonales* (definidos como individuos descendientes del mismo precursor que poseen un perfil idéntico o muy similar de marcadores genéticos determinados) entre aislados relacionados epidemiológicamente fue investigada por las técnicas de *electroforesis de campo pulsado* (ECP) y *multi-locus sequence typing* (MLST) (474).

*Electroforesis de campo pulsado* (ECP) (ver apartado 7.1.5.4 para detalles de procedimiento). La comparación visual de los patrones de ADN genómico digerido con *XbaI* (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) obtenidos por ECP aplicando los criterios estándar de Tenover y col. (456) permitió establecer cuatro categorías para definir la relación epidemiológica de los aislados: i) *indistinguibles* (sus patrones de huella dactilar no presentan bandas de diferencia);

ii) *muy relacionados* (sus patrones de huella dactilar se diferencian en 2 ó 3 bandas); iii) *posiblemente relacionados* (sus patrones de huella dactilar difieren en 4-6 bandas); y iv) *diferentes* (la diferencia entre los perfiles es  $\geq 7$  bandas). La comparación de patrones se realizó también con la ayuda de programas informáticos (ver apartado 7.1.5.7) aplicando una tolerancia de 0.1% y optimización 0.5%. Los aislados cuyos patrones presentaban una similitud  $>90\%$  fueron considerados como pertenecientes al mismo clone.

*Multi-locus sequence typing (MLST)* (ver apartado 7.1.5.6 para detalles de procedimiento). Esta técnica permitió identificar secuencias tipo (ST) prevalentes en aislados de *E. coli* aislados en amplias zonas geográficas.

#### 7.1.6.1. Determinación de grupos filogenéticos de *Escherichia coli*

La estructura poblacional de la especie de *E. coli* se compone de cuatro grupos filogenéticos predominantes y sus correspondientes sub-grupos, [A (A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>), B1, B2 (B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>) y D (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>)] que fueron identificados por un ensayo de PCR múltiple basada en la amplificación de dos genes con función conocida (*chuA* y *yjaA*) y un fragmento de ADN de función desconocida (TSPE4.C2) (figura 21, 83, 138). Los resultados de este ensayo se correlacionan con los obtenidos por la técnica de *Multi-locus Enzyme Electrophoresis* (MLEE) y ribotipia de múltiples secuencias genéticas (39, 192) utilizadas inicialmente para en estudios de estructura poblacional de la especie *E. coli*.

#### **7.1.7. Caracterización de $\beta$ -Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)**

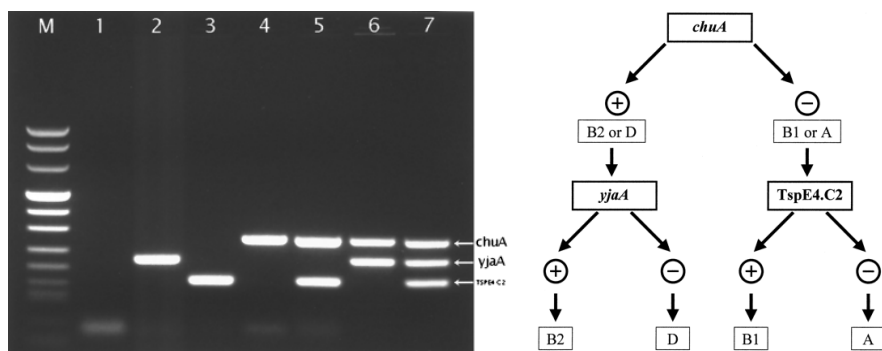
La detección y caracterización de estas enzimas incluyó la *detección fenotípica*, la *determinación de su punto isoeléctrico*, y la *amplificación* y el *análisis de su secuencia genética*.

##### 7.1.7.1. Detección fenotípica

La presencia de BLEE fue inferida a partir del ensayo fenotípico de Jarlier y *col.* conocido como test de sinergia de doble disco (Double-Disk Synergy Test; DDST) (205). Este ensayo es la aplicación de la técnica de difusión disco-placa y consiste habitualmente en la aplicación de tres discos de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos cefotaxima (30  $\mu$ g), amoxicilina/ácido clavulánico (20  $\mu$ g/10  $\mu$ g) y ceftazidima (30  $\mu$ g) a una distancia aproximada de 20 mm en ángulo de 180°C. Un aumento del halo de inhibición correspondiente a cefotaxima y/o ceftazidima en las proximidades del disco de amoxicilina/ácido clavulánico indica la presencia de una  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido, como ilustra el ejemplo de la figura 22.

### 7.1.7.2. Detección de la presencia de $\beta$ -lactamasa

Se realiza por un ensayo de actividad enzimática utilizando como sustrato una cefalosporina cromogénica conocida como nitrocefín (100 $\mu$ M) (OXOID, Basingstoke, RU) que en presencia de una  $\beta$ -lactamasa sufre un cambio de color de amarillo ( $\lambda_{\text{max}} = 390 \text{ nm}$  a pH 7.0) a rojo ( $\lambda_{\text{max}} = 486 \text{ nm}$  a pH 7.0) debido a la hidrólisis del enlace amidico del anillo  $\beta$ -lactámico. Este ensayo se realiza utilizando un extracto enzimático de la cepa problema y nitrocefín (50 $\mu$ g/ml) en cantidades iguales (3  $\mu$ l).



**Figura 21.** Identificación de los grupos filogenéticos de *E. coli* según el esquema de PCR múltiples descrito por Clermont y col. (83).



**Figura 22.** Detección de la producción de BLEE por el test de sinergia con doble disco (DDST).

### 7.1.7.3. Determinación del punto Isoeléctrico (pI)

La determinación del pI de una proteína se realiza por la técnica de isoelectroenfoque (IEF) que consiste en la separación electroforética de proteínas en un gel de poliacrilamida con un gradiente de pH creciente. Las moléculas migran en el gel desde el ánodo hasta el cátodo, hasta presentar una carga neta zero (cuando el pH del gel iguala su valor de pI). Una reacción enzimática con nitrocefín revela la presencia de la enzima cuyo pI es inferido por comparación con controles presentes en el mismo gel.

La determinación del pI de una proteína incluye 3 fases:

1) Obtención de extractos enzimáticos. Se obtienen por lisis de las células bacterianas con ultrasonidos utilizando un sonicador W380 (Heat-System Ultrasonics, New York, NY). El extracto celular se prepara a partir de un cultivo de 18h en caldo LB suplementado con 1-2µg/ml de cefotaxima/ceftazidima (dependiendo del patrón de susceptibilidad a antibióticos β-lactámicos). Se efectúa un lavado celular con tampón de fosfato sódico (PBS 0.1M, pH 7.0, véase apartado composición de soluciones en anexo 7.3) tras la centrifugación de las células y resuspensión en PBS. Todo el proceso de sonicación de los extractos congelados se realiza en hielo para evitar la degradación enzimática por el calor generado. La aplicación de ultrasonidos se realiza en ciclos de 30-60 seg aplicando pulsos de 2 seg con 50-60% ciclo on/off. Se repiten los ciclos hasta que se obtiene un extracto limpio (4-10 ciclos) que se centrifuga inmediatamente. El sobrenadante se transfiere a tubos nuevos que se almacenan a -20/-70°C.

2) Separación en el gel o isoelectroenfoque utilizando geles de poliacrilamida PhastGel IEF 3-9 (Pharmacia Biotech, Madrid, España) y la unidad de electroforesis Pharmacia Phastsystem (Global Medical Instrumentation Inc., Ramsey, Minnesota, EUA). El isoelectroenfoque consta de tres fases: i) un pre-enfoque a 15°C, 75 Vh y voltaje de 2000V en el cual se forma el gradiente de pH en el gel; ii) la aplicación automática de la muestra a partir de un peine apropiado y iii) un último paso de enfoque (500Vh, 2000V) en el cual las proteínas migran hacia el punto que corresponde a su punto isoelectrónico. Todos los geles incluyeron como controles de movilidad electroforética extractos con β-lactamasas de pI conocido. Los controles utilizados con más frecuencia fueron aquellos que contenían TEM-1 (pI=5.4), TEM-24 (pI=6.5), SHV-12 (pI=7.6) y/o CTX-M-10 (pI=8.1).

3) Tinción final del gel con 100µl de una solución de nitrocefín de 50µg/ml. La reacción enzimática con nitrocefín revela la presencia de una enzima determinada cuyo pI es inferido por comparación con controles presentes en el mismo gel.

#### 7.1.7.4. Amplificación e identificación de su secuencia genética

La presencia de BLEE de las familias de clase A más frecuentes (TEM, SHV o CTX-M) y la identificación de sus distintas variantes se determinó por amplificación de los genes *bla* con cebadores específicos y posterior secuenciación de los productos de PCR obtenidos (tabla 12). La identificación de genes *bla*<sub>CTX-M</sub> se realizó por un ensayo de PCR múltiple que permite la detección de genes que codifican enzimas de los cinco grupos de la familia CTX-M: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 (500).

#### 7.1.7.5. Localización del gen *bla*: plásmido/cromosoma

La localización de los genes *bla* fue determinada por hibridación de ADN genómico digerido con la enzima de restricción I-*CeuI* y separado por ECP (ver apartado 7.1.5.4 para detalles de procedimiento) con sondas intragénicas *bla*<sub>BLEE</sub> y 16S rADN específicas (259). La enzima I-*CeuI* reconoce solamente sitios de restricción en ADN cromosómico correspondientes a regiones específicas del operon 23S de los genomas bacterianos. La sonda de 16S rADN hibrida exclusivamente en fragmentos de cromosoma. Una hibridación positiva de ADN genómico digerido con I-*CeuI* con la sonda problema pero negativa con la sonda 16S rADN indica la localización plasmídica del gen *bla*. Una hibridación positiva de ADN genómico digerido con I-*CeuI* con la sonda problema y con la sonda 16S rADN indica la localización cromosómica del gen *bla*.

### 7.1.8. Estudios de transferibilidad

Los métodos utilizados para determinar la transferencia *in vitro* de genes *bla*<sub>BLEE</sub> fueron la *conjugación* en medio líquido y/o en filtro y la *transformación*.

#### 7.1.8.1. Conjugación

La cepa receptora utilizada en los ensayos de conjugación fue un derivado de la estirpe de *E. coli* K12 resistente al ácido nalidixico y a rifampicina, con actividad fermentadora de lactosa y curada de plásmidos, designada *E. coli* BM21R (95). Los inóculos de partida de cepas (D) y (R) fueron cultivos de 18h en aerobiosis (ajustados a  $6 \times 10^8$  células/ml) con agitación suave a 37°C en caldo LB posteriormente diluidos 1:100 en 5ml de caldo LB, obteniéndose una concentración de  $6 \times 10^6$  células /ml.

*Conjugación en medio líquido se realizó por el método de punto final ("end point")* (428). Se mezclaron las estirpes donadora y receptora (ratio 1:2, dilución D+R), cultivos que fueron incubados 18h a 37°C. Posteriormente, se inoculó 100µl de la dilución R, de la dilución D+R y



de sus correspondientes diluciones seriadas 1/10 ( $10^{-1}$ – $10^{-6}$ ) en placas de agar LB suplementadas con 1 µg/ml de cefotaxima y/o 100 µg/ml de rifampicina.

*Conjugación en filtro (“filter mating”)* (124). La preparación de los inóculos de partida de cepas donadora (D) y receptora (R) y de las diluciones y mezclas posteriores son análogas a las descritas en el apartado anterior. Las diluciones R y D+R fueron centrifugadas a 6000 r.p.m. durante 5 minutos y los “pellet” resuspendidos en 200µl de caldo LB. Estas suspensiones fueron inoculadas en filtros de nitrocelulosa de 0.45µm de poro (MF<sup>TM</sup> Membrane filters, Millipore Corporation, Concord Road, Billerica, MA, EUA) en placas de LB que se incubaron a 37°C durante 18h. Posteriormente, los filtros fueron resuspendidos en 1 mL de suero fisiológico y las soluciones obtenidas y sus correspondientes diluciones seriadas 1/10 ( $10^{-1}$  –  $10^{-6}$ ) inoculadas en placas de LB suplementadas con 1 µg/ml de cefotaxima y/o 100 µg/ml de rifampicina.

La identidad de los transconjugantes fue confirmada tras el análisis de marcadores fenotípicos específicos de las estirpes D y R. La frecuencia de conjugación se calculó dividiendo el número de UFC/ml de transconjugantes entre el número de UFC/ml de receptoras.

#### 7.1.8.2. *Transformación*

La preparación de *células competentes* se realizó por el método de CaCl<sub>2</sub> (110, 184) utilizando como *estirpes receptoras* *E. coli* MI1443 y *E. coli* GB20 (Las características de las cepas utilizadas se encuentran descritas en el apartado 7.1.5.5). Brevemente, se realizó un cultivo en 50ml de caldo LB a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica final de 0.2 (D.O.=0.2) y se procedió a un lavado de las células con CaCl<sub>2</sub> a 4°C y a una centrifugación posterior a 6000 r.p.m. durante 10 minutos. A continuación, se resuspendieron las células en un volumen de CaCl<sub>2</sub> 0.1M correspondiente a una dilución 1:100 del cultivo inicial y se guardó esta suspensión en nevera durante un tiempo máximo de 48h (414).

Tras la extracción de los plásmidos recombinantes, obtenidos según lo descrito en el apartado 7.1.5.5, utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) se procedió a su transformación en células competentes por choque térmico que consistió en la incubación de una mezcla de 100 µl de células competentes y aproximadamente 1ng de plásmido, primero en hielo durante 20 min y posteriormente en baño a 42°C durante 90 s. Finalmente, se añadió 1.5 ml de LB líquido a cada tubo de reacción y se incubó este cultivo en baño con agitación a 37°C durante 1-2 horas. La selección de los transformantes se realizó en placa de LB con los siguientes antibióticos: kanamicina (50 µg/ml) y cefotaxima (1-8 µg/ml), ceftazidima (1-8 µg/ml) o ampicilina (20 µg/ml). Cada experimento incluyó un control negativo de crecimiento y un control positivo para evaluar la eficiencia de la transformación.

#### 7.1.9. **Análisis de los Elementos de Transmisión Horizontal**

La detección, identificación y caracterización de los entornos genéticos asociados a diferentes genes *bla* incluye el análisis de ISs, plásmidos y transposones.

#### 7.1.9.1. Secuencias de inserción

La búsqueda de secuencias de inserción específicas (*ISCRI*, *IS26*, *ISEcPI*, *IS903* e *IS5075*) previamente relacionadas con genes *bla*<sub>BLEE</sub> se realizó por amplificación y posterior secuenciación de los productos de PCR obtenidos utilizando los oligos y las condiciones descritas en la tabla 12.

#### 7.1.9.2. Plásmidos

La caracterización de plásmidos comprendió la *determinación del número y el tamaño*, la *identificación del grupo de incompatibilidad* y la *comparación de los patrones de restricción* tras digestión enzimática.

##### a) Extracción de plásmidos

La obtención de plásmidos se llevó a cabo utilizando los *métodos de lisis alcalina de Birnboim y Doly* (plásmidos de 2-150kb) y el *método de Barton* (plásmidos 30->150kb) (ver apartado 7.1.5.1).

##### b) Identificación del grupo de incompatibilidad

Los plásmidos conjugativos portadores de genes *bla* fueron clasificados por un esquema de PCR descrito por Carattoli *y col.* (77) que incluye 18 pares de cebadores para la amplificación específica de los replicones FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-I<sub>γ</sub>, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F, y FIIA, representativos de los plásmidos de *Enterobacteriaceae* correspondientes a los principales grupos de incompatibilidad descritos inicialmente por Novick y Couturier en las décadas de los 70 y 80s (99, 324). Este esquema incluye 5 ensayos de PCR múltiple para la amplificación de 3 replicones cada uno y 3 ensayos de PCR simple para la amplificación de los grupos F, K y B/O (tabla 11). Las condiciones utilizadas para todas las amplificaciones excepto la correspondiente al ensayo de PCR para el replicón F fueron: 1 ciclo de 5 min a 94°C, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 20s, alineamiento a 60°C durante 30s y elongación a 72°C durante 1 min, seguidos de un paso final de 5 min a 72°C. Las condiciones del ensayo de PCR simple para la amplificación de F fueron análogas a las anteriores empleando una temperatura de alineamiento de 52°C.

La extracción de ADN empleado como molde se realizó a partir de cultivos en caldo LB suplementado con antibiótico utilizando el sistema comercial Wizard Genomic DNA

purification System (Promega, Madison, WI) que permitió la obtención de 200-400 ng de ADN total altamente purificado. La concentración de ADN empleado como molde en cada reacción de PCR varió entre 10-20ng para evitar reacciones cruzadas entre oligonucleótidos.

La identidad de los replicones fue verificada por secuenciación de los productos de PCR obtenidos. La correspondencia del replicon identificado con el plásmido que codifica para la  $\beta$ -lactamasa fue confirmada por hibridación de ADN digerido con S1 nucleasa o I-CeuI, transferido por la técnica de *Southern blot* a membranas de nylon utilizando sondas específicas de *rep* generadas por PCR (para detalles de procedimiento consultar apartado 7.1.5.6). La asociación de genes *bla* a plásmidos específicos fue establecida cuando las sondas para genes *bla* y *rep* hibridaron en el mismo fragmento de ADN.

Los controles positivos para cada replicón correspondían a fragmentos obtenidos por amplificación de plásmidos tipo de la colección de Martine Couturier clonados en el vector TA (Invitrogen-Life Technologies, Milano, Italy) cedidos por la Dra. Alessandra Carattoli, del Istituto di Sanità de Roma, y transformados en la estirpe *E. coli* DH5 $\alpha$  en nuestro laboratorio (77).

**Tabla 11** Identificación de los grupos de incompatibilidad de los plásmidos conjugativos de *Enterobacteriaceae* utilizando un esquema PCR múltiple.

	Multiplex inc/rep PCR Controls															Simplex inc/rep PCR		
	1			2			3			4			5					
	HI1	HI2	I1	X	L/M	N	FIA	FIB	W	Y	P	FIC	A/C	T	Fils	F	K	B/O
HI1 (471bp)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HI2 (644bp)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I1 (139bp)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X (376bp)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L/M (785bp)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N (559bp)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FIA (462bp)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FIB (702bp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W (242bp)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y (765bp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P (534bp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
FIC (262bp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
A/C (465bp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
T (750bp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
repFIIA (270bp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
F (270bp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
K (160bp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
B/O (159bp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Este sistema está basado en la detección de secuencias asociadas al control de replicación de los plásmidos conjugativos.

### c) Discriminación entre plásmidos

La discriminación entre plásmidos de peso molecular similar y grupo de incompatibilidad análogo se realizó por comparación de sus patrones de huella dactilar ("*plasmid fingerprinting*") generados por la digestión del ADN plasmídico de doble cadena, que corresponde a la forma

covalente circular cerrada (CCC), con enzimas de restricción que dan lugar a fragmentos de ADN lineal. Para que los resultados puedan ser interpretables, los patrones deben tener entre 5 y 15 bandas. La elección de las enzimas de restricción se realiza habitualmente de forma empírica ya que en la mayoría de los casos la secuencia de los plásmidos a analizar se desconoce. En este trabajo se utilizaron las enzimas de restricción *EcoRI*, *PstI*, *HpaI*, *BamHI*, o *HindIII* (Takara Bio Inc, Shiga, Japón).

En la actualidad *no existen criterios que establezcan el número de bandas que deben compartir dos plásmidos para ser considerados idénticos o posiblemente relacionados*. En general, consideramos que dos plásmidos estaban genéticamente relacionados cuando comparten  $\geq 3$  sitios de restricción para una enzima determinada. Esto suele confirmarse al menos para 2 enzimas de restricción diferentes. El análisis computarizado (ver apartado 7.1.5.7) permitió establecer el grado de asociación entre plásmidos con diferentes patrones de huella dactilar.

#### d) Determinación de número y tamaño molecular

La estimación del *peso molecular* de un plásmido se realizó por comparación de la movilidad electroforética de sus formas CCC con la de plásmidos de tamaño molecular conocido (electroforesis de corriente continua), por comparación de la movilidad electroforética de sus formas lineares tras digestión con S1 nucleasa (técnica de Barton, ver apartado 7.1.5.1), o por la suma del tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos tras digestión enzimática (402).

#### 7.1.9.3. Integrones

La caracterización de integrones comprendió su detección y discriminación empleando distintas técnicas moleculares. Las cepas utilizadas como controles positivos de integrones de clase 1, 2 y 3 fueron proporcionadas por Aida Duarte (Univ. de Lisboa, Portugal), John Maurer (Univ. de Georgia, Athens, EUA), Carmen Mendoza (Univ. de Oviedo, España) y Hatch Stokes (Macquarie Univ., Sydney, Australia).

La *determinación de la presencia de integrones* se realizó por PCR utilizando ADN genómico como molde y cebadores específicos para la amplificación de los genes que codifican las integrasas de integrones de clase 1, 2 y 3 (*intI1*, *intI2* e *intI3*) y de los *gene cassettes* de sus partes variables. Las secuencias de los cebadores y las condiciones de PCR utilizadas son descritas en la tabla 12.

La *discriminación entre integrones* para los que la amplificación de la parte variable (5'CS-3'CS para los integrones de clase 1 y *attI2-orfX* para los integrones de clase 2) dio un producto de PCR de peso molecular similar se realizó por comparación de los patrones de huella dactilar generados tras digestión con las enzimas *AluI* y *HaeIII*, respectivamente. Los

fragmentos obtenidos fueron separados en un gel de agarosa al 2.5% y visualizados tras tinción con BrEt tal y como se ha descrito en el apartado 7.1.5.4. Cada integrón fue designado por un número romano y un subíndice que indica el tipo y la clase de integrón.

a) Entorno genético de integrones de clase 1: Caracterización de Tn402 y Tn21

Los integrones de clase 1 son considerados variantes defectivas de Tn402, que se encuentran frecuentemente asociados a Tn21. La caracterización de su entorno incluyó el análisis de la presencia de secuencias derivadas de Tn402 y Tn21 por ensayos de PCR, hibridación y secuenciación.

*Caracterización de Tn402.* Comprende el análisis de la secuencia de *intI1* y la detección de *orf5*, *IS1326*, *IS1353* e *IS6100* cuya inserción en el módulo *tni*<sub>Tn402</sub> ha permitido sub-clasificar los integrones de clase 1 en los tipos In0, In2 o In4. La presencia de *ISCR1* asociada a integrones de clase 1 con dos extremos 3'-CS fue también analizada. La asignación preliminar de cada uno de los tipos fue confirmada por ensayos de PCR solapante utilizando cebadores basados en secuencias previamente publicadas y posterior secuenciación de los fragmentos obtenidos (figura 23).

La variabilidad asociada a In60, un integrón de clase 1 inusual con dos regiones 3'-CS e *ISCR1* fue analizada por la estrategia mencionada en el párrafo anterior en una colección de 70 aislados productores de CTX-M-9 (número de acceso Genbank AF174129).

*Caracterización de transposones mercuriales derivados de Tn21.* La presencia de derivados de Tn21 fue analizada por amplificación de secuencias específicas de su módulo de transposición *tni*<sub>Tn21</sub> (*tnpA*, *tnpM*, *tnpR*) y del gen *merA* presente en el operon mercurial correspondientes a los extremos 5' y 3' de este transposón, respectivamente. La caracterización completa de estructuras derivadas del Tn21 o del Tn1696 se realizó por ensayos de PCR solapadas basadas en secuencias conocidas (números de acceso Genbank AF071413 y U12338, respectivamente) (figura 23).

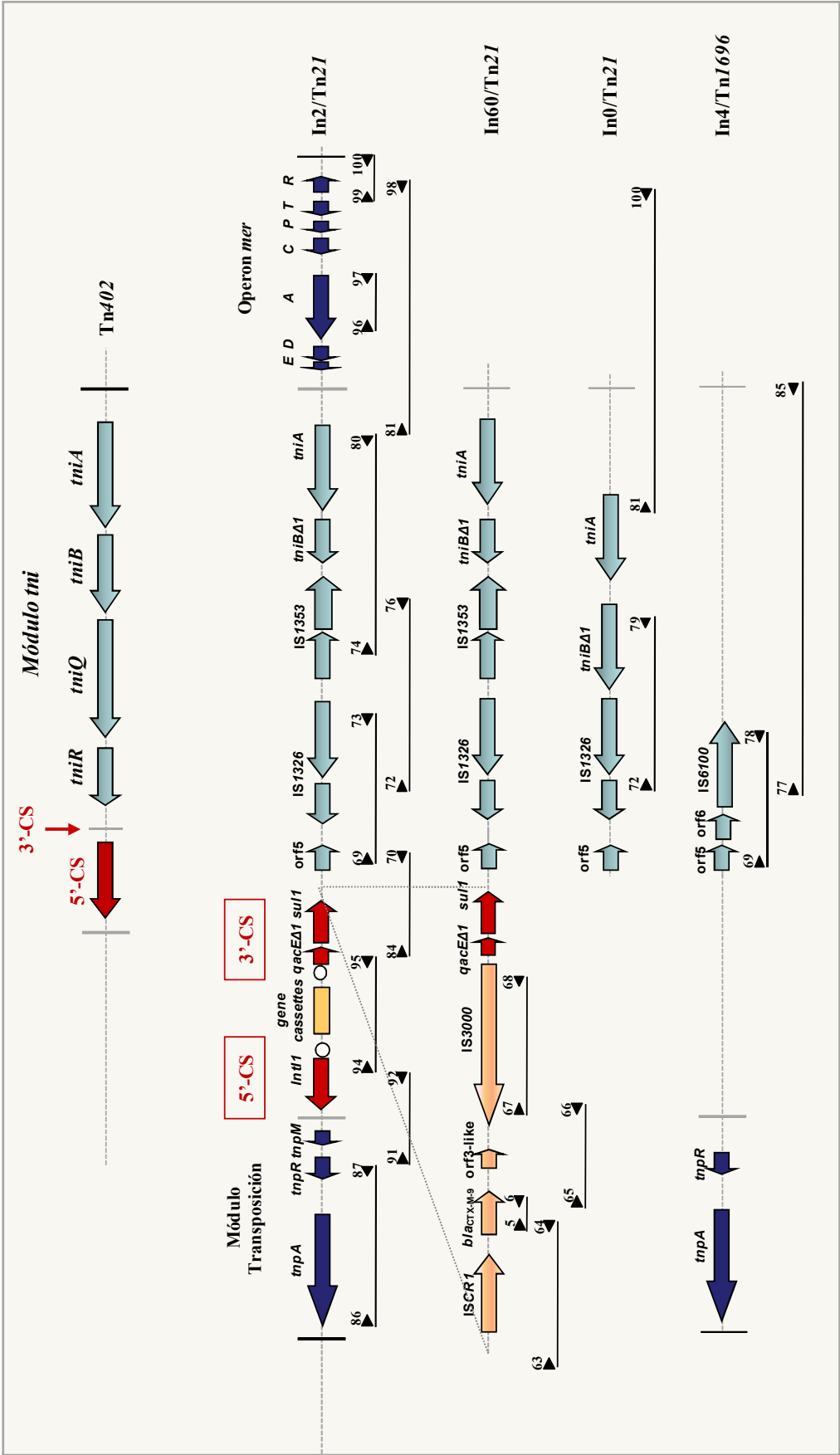


Figura 23. Esquema de PCR solapantes utilizado para la caracterización de integrones de clase 1 derivados de Tn402 y transposones mercuriales de la familia Tn21. Los oligonucleótidos empleados se incluyen en la tabla 12.

#### 7.1.10. Evolución de genes pertenecientes a la familia *bla*<sub>CTX-M-1</sub>

La evolución de las enzimas pertenecientes a la familia CTX-M-1 fue investigada evaluando la relación de determinadas mutaciones con fenotipos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos específicos.

Una estrategia de pases seriados *in vitro* usando una cepa hipermutadora y ceftazidima como agente selector fue la técnica utilizada para la mimetización de la evolución natural de las enzimas del grupo CTX-M-1 (CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-15 y CTX-M-32) y la predicción de la aparición de nuevos mutantes resistentes (150, 332).

##### 7.1.10.1. Obtención de transformantes

Los plásmidos recombinantes pBX1, pBX3, pBX10, pBX15 y pBX32 obtenidos tras clonación de los genes *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, *bla*<sub>CTX-M-10</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>CTX-M-32</sub>, en pBGS18 fueron transformados en la estirpe normomutadora *E. coli* MI1443 y en la estirpe hipermutadora *E. coli* GB20 (ver apartados 7.1.5.5 y 7.1.8.2). Los transformantes en la cepa MI1443 fueron utilizados como cepas control en las determinaciones de sensibilidad por microdilución en caldo a antibióticos  $\beta$ -lactámicos (cefotaxima, ceftazidima, cefepima, aztreonam y amoxicilina-ácido clavulánico) y sus valores de CMI considerados como referencia. Los transformantes en GB20 fueron sometidos a pases seriados en concentraciones crecientes de ceftazidima (CAZ).

##### 7.1.10.2. Pases seriados en concentraciones crecientes de ceftazidima

Los transformantes en la cepa hipermutadora *E. coli* GB20 se inocularon en seis tubos independientes conteniendo 5 ml de caldo Luria-Bertani (LB) suplementado con tetraciclina (20 $\mu$ g/ml), kanamicina (50 $\mu$ g/ml) y ceftazidima (en un rango creciente desde una concentración 2 veces inferior al valor de su CMI hasta 128 $\mu$ g/ml (42, 150). De cada uno de los cultivos realizados a diferentes concentraciones de ceftazidima, se extrajo ADN plasmídico total que fue transformado en la estirpe *E. coli* MI1443 y se seleccionaron los transformantes en LB suplementado con kanamicina (50 $\mu$ g/ml) y ceftazidima (4X la CMI correspondiente a la cepa portando el gen original). Los clones seleccionados fueron transformados nuevamente en MI1443, utilizando kanamicina (50 $\mu$ g/ml) como agente selector y en ausencia de ceftazidima, para evitar la selección de variantes cromosómicas debidas a alteraciones de permeabilidad de membrana. Los valores de CMI para los mutantes obtenidos fueron determinados por microdilución en caldo Muller-Hinton siguiendo las normas de CLSI (85) (véase apartado 7.1.4.2). Los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> correspondientes a mutantes con valores de CMI a ceftazidima superiores dos o más veces al de los transformantes de referencia portadores de plásmidos recombinantes no evolucionados fueron secuenciados.

### 7.1.10.3. *Mutagénesis dirigida*

El efecto de las mutaciones A77V, N106S, P167S y D240G sobre los fenotipos de resistencia a ceftazidima fue analizado en distintos contextos genéticos. Los cambios correspondientes ( $C^{230} \rightarrow T$ ,  $A^{317} \rightarrow G$ ,  $C^{508} \rightarrow T$  y  $A^{725} \rightarrow G$ , respectivamente) se introdujeron en los genes *bla* del grupo CTX-M-1, tanto en los genes salvajes, como en variantes obtenidas en los experimentos de pases seriados que conferían susceptibilidad disminuida a ceftazidima. En un primer paso se amplificaron dos fragmentos del gen pretendido utilizando los cebadores directo (AV-F, NS-F, PS-F o DG-F) y reverso (AV-R, NS-R, PS-R, o DG-R) correspondientes, conteniendo la mutación a introducir, en combinación con los cebadores CTX-M-Pst (reverso) y CTX-M-Eco (directo), respectivamente. Por último, se realizó una PCR final con los cebadores CTX-M-Eco y CTX-M-Pst, usando como molde el ADN de los productos intermediarios purificado a partir del gel de agarosa 0.8% (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, GmbH, Hilden, Germany). Los cebadores empleados y las condiciones de las reacciones de PCR se describen en la tabla 12. Los productos de ADN purificados (QIAquick PCR<sup>®</sup>; Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) y el plásmido vector se digirieron con las enzimas *EcoRI* and *PstI*, se ligaron y se transformaron en MI1443, seleccionando en placas de LB agar conteniendo kanamicina (50µg/ml) y ceftazidima (1-8µg/ml) o kanamicina (50µg/ml) y cefotaxima (1µg/ml) y posteriormente re-transformados seleccionando con kanamicina (50µg/ml) (véase apartados 7.1.5.5 y 7.1.8.2). Los plásmidos recombinantes se enviaron a secuenciar para confirmar la presencia de la mutación deseada. Los valores de CMI para los mutantes obtenidos fueron determinados por E-test (véase apartado 7.1.4.2).



**Tabla 12.** Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR, condiciones de amplificación para caracterización de *Enterobacteriaceae* portadores de genes *blap*

N°	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Aplicación	N° Acceso Genbank	Posición	Referencia	Condiciones de PCR
1	TEM F	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG		-	208-228	267	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
2	TEM R	CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA		-	1075-1055		
3	SHV F	GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC		M59181	58-77	267	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
4	SHV R	TTA GCG TTG CCA GTG CTC		M59181	988-971		
5	CTX-M-9 F	ATG ATT CTC GCC GCT GAA GCC		AF174129	6339-6359	411	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 62°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
6	CTX-M-9 R	ATG ATT CTC GCC GCT GAA GCC		AF174129	7195-7175		
7	CTX-M-10 F	CCG CGC TAC ACT TTG TGG C	Detección de genes <i>bla</i>	AY598759	4924-4942	328	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 59°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
8	CTX-M-10 R	TTA CAA ACC GTT GGT GAC G		AY598759	5885-5867		
9	CTX-M-1 F	ATG GTT AAA AAA TCA CTG CGC C		Y10278	1-22	484	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 62°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
10	CTX-M-1 R	TCC CGA CGG CTT TCC GCC TT		AJ005044	833-814		
11	OXA-1 F	TTT TCT GTT GTT TGG GTT TT		AY458016	11200-11182	35	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
12	OXA-1 R	TTT CTT GGC TTT TAT GCT TG		AY458016	10754-10773		
13	ChuA.1	GAC GAA CCA ACG GTC AGG AT		-	-	84	
14	ChuA.2	TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA		-	-		
15	YjaA.1	TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG	Identificación de grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	-	-	84	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 59°C, 30 seg a 72°C; 1 ciclo de 7 min a 72°C
16	YjaA.2	ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC		-	-		
17	TspE4C2.1	GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA		AF222188	8-28	84	
18	TspE4C2.2	CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG		AF222188	160-141		

**Tabla 12. Cont.**

N°	Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Aplicación	N° Acceso Genbank	Posición	Referencia	Condiciones de PCR
19	aadK F	ATT CTG CTT GGC GCT CCG GG		NC010473	-		
20	aadK R	CCG TCA ACT TTC GCG TAT TT		NC010473	-		
21	icd F	ATG GAA AGT AAA GTA GTT GTT CCG GCA CA		NC010473	-		1 ciclo de 2 min a 95°C; 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 54°C, 2 min a 72°C; 1 ciclo de 5 min a 72°C
22	icd R	GGA CGC AGC AGG ATC TGT T		NC010473	-		
23	purA F	TCG GTA ACG GTG TTG TGC TG		NC010473	-		
24	purAR	CAT ACG GTA AGC CAC GCA GA		NC010473	-		
25	fumC F	TCA CAG GTC GCC AGC GCT TC		NC010473	-		1 ciclo de 2 min a 95°C; 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 57°C, 2 min a 72°C; 1 ciclo de 5 min a 72°C
26	fumC R	GTA CGC AGC GAA AAA GAT TC	MLST <i>E. coli</i>	NC010473	-	<a href="http://www.mlst.net">www.mlst.net</a>	
27	recA F	AGC GTG AAG GTA AAA CCT GTG		NC010473	-		1 ciclo de 2 min a 95°C; 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 58°C, 2 min a 72°C; 1 ciclo de 5 min a 72°C
28	recA R	ACC TTT GTA GCT GTA CCA CG		NC010473	-		
29	gyrB F	TCG GCG ACA CGG ATG ACG GC		NC010473	-		
30	gyrB R	GTC CAT GTA GGC GTT CAG GG		NC010473	-		1 ciclo de 2 min a 95°C; 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, 2 min a 72°C; 1 ciclo de 5 min a 72°C
31	mdh F	ATG AAA GTC GCA GTC CTC GGC GCT GCT GGC GG		NC010473	-		
32	mdh R	TTA ACG AAC TCC TGC CCC AGA GCG ATA TCT TTC TT		NC010473	-		
33	CGA F	GCT ATC TGG CAG ACT	Identificación de Grupo Clonal A (CgA)	AY464441	66-84		1 ciclo de 10 min a 95°C; 25 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 63°C, 3 min a 68°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
34	CGA R	CGT GCA TCG CCG TTG GAA AG		AY464441	240-220	210	

**Tabla 12. Cont.**

N°	Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Aplicación	N° Acceso Genbank	Posición	Referencia	Condiciones de PCR
35	ISEp1 F	ATC TAA CAT CAA ATGCAG G		AJ972954	153-172	132	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 59°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
36	ISEp1 R	AGA CTG CTT CTC ACA CAT		AJ972954	1535-1517	132	
37	IS26 F	AGC GGT AAA TCG TGG AGT GA		AF205943	324-344	322	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 61°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
38	IS26 R	AG GCC GGC ATT TTC AGC GTG		AF205943	960-979	322	
39	IS903 F	CAT ATG AAA TCA TCT GCG C	Presencia de	EU056266	7863-7883	372	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 53°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
40	IS903 R	CCG TAG CGG GTT GTG TTT TC	Secuencias de	EU256266	8335-8316		
41	ISCR1 F	TC GCT GCG AGG ATT GTC ATC	Inserción (IS)	AF174129	4692-4711	322	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 57°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
42	ISCR1 R	C TCG CTT GAG GCG TTG CAT		AF174129	5791-5773		
43	IS5075 F	CTT ATT GGT ATC GAT CTG GGT A		AY196695	2101-2022	<i>Novais y col., en</i>	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
44	IS5075 R	TCG TCC AAC TTT CGT TTC AAC		AY196695	2699-2669	<i>preparación</i>	
45	Int1 F	GGG TCA AGG ATC TGG ATT TCG		U49101	786-766	267	1 ciclo de 12 min a 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 62°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 8 min a 72°C
46	Int1 R	ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC G		U49101	303-324		
47	Int2 F	CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG T	Identificación	L10818	219-240	267	1 ciclo de 12 min a 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 62°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 8 min a 72°C
48	Int2 R	GTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G	de integrones	L10818	1007-986		
49	Int3 F	AGT GGG TGG CGA ATG AGT G		D50438	178-196	267	1 ciclo de 12 min a 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 8 min a 72°C
50	Int3 R	TGT TCT TGT ATC GGC AGG TG		D50438	777-758		
51	sul1F	CGG CGT GGG CTA CCT GAA CG	Identificación	AF174129	3508-3528	322	1 ciclo de 12 min a 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 62°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
52	sul1R	GCC GAT CGC GTA AGT TCC G	de genes <i>sul</i>	AF174129	3940-3921		

**Tabla 12. Cont.**

N°	Oligonucleotidos	Secuencia (5'-3')	Aplicación	N° Acceso Genbank	Posición	Referencia	Condiciones de PCR
53	sul2 F	GCG CTA AGG CAG ATG GCA TT	Identificación de genes <i>sul</i>	AY360321	243-263	225	1 ciclo de 4 min a 95°C; 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 54°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 7 min a 72°C
54	sul2 R	GCG TTT GAT ACC GGC ACC CGT		AY360321	528-508	225	
55	sul3 F	GAG CAA GAT TTT TGG AAT CGT		AJ459418	2980-3001	225	1 ciclo de 4 min a 95°C; 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 54°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 7 min a 72°C
56	sul3 R	CTA ACC TAG GGC TTT GGA TA		AJ459418	3770-3750		
57	16S rADN F	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG	Preparación de sonda 16S rADN	J01695	1275-1294	489	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 54°C, 1.2 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
58	16S rADN R	AAG GAG GTG ATC CAG CC		J01695	2808-2802		
59	5'CS F	GGC ATC CAA GCA GCA AG	Caracterización del In60	AF174129	1236-1252	322	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 52°C, 2.5 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
60	aadA2 R	TGA CTT GAT GAT CTC GCC		AF174129	2709-2692		
61	aadA2 F	GCT GGC CGT GCA TTT GTA CG		AF174129	2013-2032	322	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C, 2.5 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
62	sul1R	GC AAG GCG GAA ACC CGC G		AF174129	3704-3687		
63	sul1F	GCG CGG GTT TCC GCC TTG GGA	Identificación de derivados del Tn402	AF174129	3687-3703	322	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C, 2.5 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
64	CTX-M-9 Rf	CCG TTG CAC TCT CTT TGT CA		AF174129	6359-6339		
65	CTX-M-9 Fr	GGC TTC AGC GGC GAG AAT CAT		AF174129	7175-7195	322	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C, 2.5 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
66	tnpA R	C GCT CAA TCG AGG GAT ATT TAC		AF174129	9313-9292		
67	tnpA F	GTA AAT ATC CCT CGA TTG AGC G	Identificación de derivados del Tn402	AF174129	9292-9313	322	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C, 2.5 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
68	IS3000 R	GCC GTC TGT GGC CTC CAG		AF174129	12383-12366		
69	orf5 F	CGA TAT CGA CGA GGT TGT GC		AF071413	7712-7730	322	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 57°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
70	orf5 R	AGT TCT AGG CGT TCT GCG		AF071413	8157-8140		

Tabla 12. Cont.

N°	Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Aplicación	N° Acceso Genbank	Posición	Referencia	Condiciones de PCR
71	orf6 R	TAT CTT CGG CCT TCA CAC G		U12338	10486-10468	<i>Novais y col., en preparación</i>	-
72	IS1326 F	TAC CGG GTC TTA TGA CCG AGT		AF071413	10357-10337	322	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 59°C, 1.5 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
73	IS1326 R	ACT GTC ATA GCG GTT CAC GTT		AF071413	9141-9161		
74	IS1353 F	TGC AGC ATT GTC TTG CGA GCA		AF071413	12113-12093	322	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 59°C, 1.5 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
75	IS1353 Rf	TGC TCG CCA GAC AAT GCT GCA		AF071413	12093-12113	322	
76	IS1353 R	ACA CTA CGG CAG CTG GGA TA		AF071413	10830-10849	322	
77	IS6100 F	GGC TCT GTT GCA AAA ATC GTG AAG		AY463797	4669-4692	322	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 61°C, 2 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
78	IS6100 R	GGC TCT GTT GCA AAG ATT GGC	Identificación de derivados	AY463797	5548-5528		
79	tniBA1 R	AGC ATC ATC GGC TCG AAG C	defectivos del Tn402	AF071413	12588-12606	322	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1.5 min a 57°C, 3 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
80	tniA F	AGA TGC GTG AGA TTG TGA CC		AF071413	13406-13387	322	
81	tniA R	GGA CTG ATG ATC TCC GCA CGA		AF071413	14801-14821	322	-
82	IRIn2 F	TTT CAG AAG ACG GCT GCA CTG		AF071413	4046-4066	322	1 ciclo de 1 min a 94°C; 35 ciclos de 20 seg a 96°C, 1 min a 60°C, 3 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
83	qacEΔ1B	CAA GCT TTT GCC CAT GAA GC		AF071413	3132-3113		
84	qacEΔ2	ATC GCA ATA GTT GGC GAA GT		AF071413	2906-2926	322	-
85	IRT	T TTT CAG AAG ACG ACT GCA CCA		AF071413	15012-15033	<i>Novais y col., en preparación</i>	-
86	IR1 Tn21	GGG TCG TCT CAG AAA ACG G	Caracterización	AF071413	1-38		1 ciclo de 1 min a 94°C; 35 ciclos de 20 seg a 96°C, 1 min a 55°C, 4 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
87	tmpR F	CCG TGG TGG TGC ATA GCA T	del Tn21	AF071413	3394-3376	322	

**Tabla 12.** Cont.

N°	Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Aplicación	N° Acceso Genbank	Posición	Referencia	Condiciones de PCR
88	tnpM F	GTG TGG AAA CAC CCG ACT G		AF071413	4020-4002	<i>Novais y col., en</i>	-
89	tnpM R	ACA AGC GTC CGG TTT GAC G		AF071413	3711-3728	<i>preparación</i>	-
90	tnpA R	CAA GGC GGT TGA AGA ACA CG		AF071413	309-328	<i>Novais y col., en</i> <i>preparación</i>	-
91	tnpR R	ATG CTA TGC ACC ACC ACG G		AF071413	3376-3394		1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 60°C, 3 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
92	intF1	GGG TCA AGG ATC TGG ATT TCG		AF071413	4775-4755	322	
93	intR1	ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC G		AF071413	4312-4333	322	1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C, 2,5 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
94	5'CS R	CT TGC TGC TTG GAT GCC		AF071413	1252-1236		
95	3'CS R	AAG CAG ACT TGA CCT GAT	Caracterización del Tn2I	AF071413	2813-2830	322	
96	merA1	ACC ATC GGC GGC ACC TGC GT		AF071413	17597-17578		1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 65°C, 3 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
97	merA5	ACC ATC GTC AGG TAG GGG AAC AA		AF071413	16360-16382	322	
98	merR1	GCG GAT TTG CCT CCA CGT TGA		AF071413	19278-19260		( <i>merTl-merR1</i> ): 1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 60°C, 3 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
99	merT1	CCA GGC AGC AGG TCG ATG CAA G		AF071413	19055-19076	322	
100	Tn2IIR/38	GGG CAC CTC AGA AAA CGG AAA		AF071413	19669-19649	322	( <i>merTl-Tn2IIR/38</i> ): 1 ciclo de 12 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 59°C, 1,5 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
101	aacA4 F	TGA CCT TGC GAT GCT CTA TG		L06822	1870-1851		-
102	aacA4 R	CGG TAC CTT GCC TCT CAA AC		L06822	2709-2690	<i>Novais y col., en</i> <i>preparación</i>	-
103	dfrA1 Rv	GTT CAC CTT TGG CAC TCC AT		AY963803	2709-2690		-

**Tabla 12. Cont.**

N°	Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Aplicación	N° Acceso Genbank	Posición	Referencia	Condiciones de PCR
104	aac-cr- F	TTG CGA TGC TCT ATG AGT GG	Identificación de genes de resistencia aminoglicósidos	DQ303918	97-117	399	1 ciclo de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C
105	aac-cr- R	GCG TGT TCG CTC GAA TGC C		DQ303918	588-569	399	
106	CTX-M-Eco <sup>a</sup>	GGAATTCGA CTA TTC ATG TTG TTG TTA TT		DQ328958	-47-26 río arriba de <i>bla</i> incluye codon stop	323	94°C por 12 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 54°C por 1 min y 72°C por 1 min, 72°C por 10 min
107	CTX-M-Pst <sup>a</sup>	AACTGCAGT TCC GCTA TTA CA AAC CGT		DQ328958	229-254	323	
108	A77V F	TGA TGG CCG TGG CCG CGG TGC TGA A		DQ328958	254-229	323	
109	A77V R	TTC AGC ACC GCG GCC ACG GCC ATC A		DQ328958	311-333	323	<i>Productos intermedios:</i> 94°C por 12 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 54°C por 1 min y 72°C por 1 min, 72°C por 10 min
110	N106S F	CCT TGT TAA CTA TAG TCC GAT T	Obtención de variantes	DQ328958	337-318	323	<i>Productos finales:</i> 94°C por 12 min, 15 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min y 72°C por 1 min, 20 ciclos de 94°C por 1 min, 72°C por 1.5 min, 72°C por 10 min
111	N106S R	CCG CAA TCG GAC TAT AGT T	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> por mutagénesis dirigida	DQ328958	498-520	323	
112	P167S F	CGT ACC GAG TCG ACG TTA AAC A		DQ328958	520-498	323	
113	P167S R	TGT TTA ACG TCG ACT CGG TAC G		DQ328958	709-728	323	
114	D240G F	AAA CCG GCA GCG GTG GCT AT		DQ328958	729-709	323	
115	D240G R	ATA GCC ACC GCT GCC GGT TT		DQ328958			

<sup>a</sup> Los sitios de restricción *EcoRI* y *PstI* están representados como caracteres subrayados en los primer CTX-M-Eco y CTX-M-Pst, respectivamente. Las letras en *italico* del primer CTX-M-Pst representan el codón stop.

## 7.2. ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMX	Amoxicilina-ácido clavulánico
ARN	Ácido ribonucleico
BLEE	$\beta$ -Lactamasa de Espectro Extendido
CAZ	Ceftazidima
CCC	Forma plasmídica Covalente Circular Cerrada
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CEF	Cefepima
CFX	Cefuroxima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CTX	Cefotaxima
DDST	<i>Double Disk Sinergy Test</i> o test de sinergia de doble disco
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
ECP	Electroforesis de Campo Pulsado
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ETH	Elementos de transferencia horizontal
FEP	Cefepima
IEF	Isoelectroenfoque
IS	<i>Insertion Sequence</i> o secuencia de inserción
LB	Luria Bertani agar
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> o reacción en cadena de la polimerasa
pI	Punto isoelectrónico
MLEE	<i>Multi-Locus Enzyme Electrophoresis</i>
MSLT	<i>Multi-Locus Sequence Typing</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PBP	<i>Penicillin Binding Protein</i>
TA	Toxina-antitoxina
RM	Restricción-modificación





## 7.3. COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES

### 1. Medio de Luria Bertani (LB)

Para 1 L: Disolver 10g de triptona, 5g de extracto de levadura, 10g de NaCl y ajustar a 1 L con agua destilada.

### 2. Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico: (1:2:1)

Para 100mL : 50 g de cristales de fenol, 48mL de cloroformo, 2 mL de alcohol isoamílico, 10mL de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH =8.0). Almacenar en botella topacio a 4°C.

### 3. Ribonucleasa (ARNasa-A, Sigma Aldrich Cat# 5503).

Preparar una solución stock de 10mg/mL en agua destilada hirviendo durante 15 min para eliminar cualquier resto de actividad ADNasa. Dejar enfriar a temperatura ambiente, alicuotar y congelar.

### 4. Bromuro de etidio (stock=5mg/mL)

Diluir a 0.2µg/mL para teñir los geles. Una solución de trabajo se prepara con 100µL de solución stock en 500mL de agua destilada.

Las soluciones de BrEt han de ser manejadas con precaución ya que es un potente agente mutágeno. Siempre han de ser utilizadas con guantes y el **BrEt ha de ser inactivado** antes de ser desechado.

### 5. Buffer de electroforesis (TBE concentración 10x):

Composición: 890 mM Tris, 890 mM Acido bórico, 20 mM EDTA pH 8

Para 1 L: 108 g Tris base, 55 g ácido bórico y 40 ml EDTA 0,5 M pH 8.

Autoclavar en alícuotas de 500 ml ó 1 L.

### 6. Buffer de carga: 0.25% de azul de bromofenol en 60% (peso/volumen) de sucrosa.

Almacenar en nevera.

### 7. Extracción de plásmidos

#### a. Solución I.

Para Gram Negativos: TEG - 50mM Tris-HCl (pH = 8), 10mM EDTA y 2% glucosa)

**b. Solución II (solución de lisis)**

1 % SDS, 0.2N NaOH, preparada en el momento.

Para 100mL : 1g SDS, 4ml NaOH 5N, 96mL de H<sub>2</sub>O. Esta solución debe ser siempre preparada en el momento.

**c. Solución III (solución de precipitación)**

3M acetato potásico pH=5. Ajustar el pH con ácido acético glacial.

**8. PIV:** 10mM Tris-HCl (pH7.6), 1M NaCl

Para 1 L: 10 ml Tris-HCl 1M (pH 7.5), 200ml de NaCl 5M, 790ml agua destilada. Autoclavar en alícuotas de 500 ml.

**9. ESP:** 0.5M EDTA (pH 9.0-9.5), 1% sarcosyl, 50µg/ml proteinasaK

Para 1 L: 50ml de EDTA 1M, 5ml sarcosyl 20% y 800ml agua destilada. Adicionar 200µl de proteinasaK en hielo y completar el volumen con agua destilada.

**10. TE:** 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1mM EDTA (pH 8)

Para 1 L: 10 ml Tris-HCl 1M (pH 7.5), 2 ml EDTA 0,5M (pH 8.0), 988 ml agua destilada. Autoclavar en alícuotas de 500 ml ó 1 L

**11. Tris-HCl:** 1 M, pH=8

Para 1L: 121.1g de Tris base en 800 ml de agua destilada.

Ajustar el pH a 8.0 con HCl. Completar volumen a 1L. Autoclavar.

**12. NaOH:** 10N

Para 1L: 400g de NaOH en 800 ml de agua destilada.

Completar volumen a 1L.

**13. EDTA:** 0.5 M, pH=8

Para 1 L: 186.1g Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O (PM=372.24)

Añadir 800ml de agua destilada

Ajustar a pH=8.0 con NaOH y completar volumen a 1L.

**14. NaCl:** 5M

Para 1L: 58.4g NaCl, disolver en agua destilada y completar el volumen.

Autoclavar.

15. **SDS:** 20%

Para 100ml: 20g en 70ml de agua destilada. Completar volumen con agua destilada y esterilizar con filtro apropiado.

16. **NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O:** 0.5M pH=7

Para 100ml: 6.9g en 80ml agua destilada. Ajustar el pH con NaOH. Completar el volumen con agua destilada. Autoclavar.

17. **MgCl<sub>2</sub>:** 1M

Para 50ml: 10.16g MgCl<sub>2</sub> en agua destilada hasta completar volumen. Autoclavar.

18. **SSC 20X:** 3M NaCl, 0.3M Na<sub>3</sub>(C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O(COO)<sub>3</sub>)

Para 1L: 175.31g NaCl, 88.23g Na<sub>3</sub>(C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O(COO)<sub>3</sub>) en 800ml de agua destilada. Completar el volumen con agua destilada y autoclavar.

19. **PBS:** 0.1M, pH=7

Para 1 L: 577ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M y 423ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M.

20. **Controles de peso molecular**

Plásmidos de tamaño molecular conocido: Los dos controles más utilizados son cepas de *Escherichia coli* que contienen distintos plásmidos: *E. coli* NCTC 50192 (cuatro plásmidos de 7, 36.2, 63.8 y 148.5 kb, respectivamente) y *E. coli* V517 (ocho plásmidos de peso molecular comprendido entre 2.1 y 54.2 kb). Estas cepas están disponibles en la Colección Española de Cultivos Tipo (<http://www.cect.org>). Cepas con plásmidos de conocido peso molecular pueden ser obtenidas a través del Plasmid Reference Laboratory, Department of Microbiology de la Universidad de Standford, Palo Alto, California (EEUU).



## 7.4. PUBLICACIONES

### 7.4.1. ARTÍCULOS ORIGINALES

7.4.1.1. Novais A., Machado E., Cantón R., Peixe L., Baquero F., y T.M. Coque. 2008. A multi-resistant IncA/C<sub>2</sub> plasmid containing Tn21 and Tn1696 derivatives causes international spread of TEM-24 among *Enterobacteriaceae*. En revision editorial.

7.4.1.2. Novais A., Cantón R., Coque T.M., Moya A., Baquero F., y J.C. Galán. 2008. Mutational events in ESBL-ceftaximases of the CTX-M-1 cluster involved in ceftazidime resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(7) En prensa.

**Índice de impacto: 4,379.**

7.4.1.3. Coque T.M., Novais A., Carattoli A., Poirel L., Pitout J., Peixe L., Baquero F., Cantón R., Nordmann P. 2008. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Emerg Infect Dis.* 14(2):195-200.

**Índice de impacto: 5, 308.**

7.4.1.4. Novais A., Cantón R., Moreira R., Peixe L., Baquero F., y T.M. Coque. 2007. Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad host range (CTX-M-1, -3, -32) plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(2):796-9.

**Índice de impacto: 4,379.**

7.4.1.5. Novais A., Cantón R., Valverde A., Machado E., Galán J.C., Peixe L., Carattoli A., Baquero F., y T.M. Coque. 2006. Dissemination and persistence of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1- $\alpha$ , and IncFI groups. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(8):2741-50.

**Índice de impacto: 4,379.**

7.4.1.6. Machado E., Ferreira J., Novais A., Peixe L., Cantón R., Baquero F., y T.M. Coque. 2007. Preservation of integron types among *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in a spanish hospital over a 15-year period (1988-2003). *Antimicrob Agents Chemother.* 51(6):2201-4.

**Índice de impacto: 4,379.**

- 7.4.1.7. Machado E., Coque T.M., Cantón R., Novais A., Sousa J.C., Baquero F., Peixe L., y the Portuguese Resistance Study Group. 2007. High diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. *J Antimicrob Chemother.* 60(6):1370-4.

**Índice de impacto: 3,886.**

- 7.4.1.8. Morosini M., García-Castillo M., Coque T.M., Valverde A., Novais A., Loza E., Baquero F., y R. Cantón. 2006. Antibiotic coresistance in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and *in vitro* activity of tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(8):2695-2699.

**Índice de impacto: 4,379.**

## 7.4.2. MANUSCRITOS EN PREPARACIÓN

- 7.4.2.1. Novais A., Comas I., Cantón R., Coque T.M., Baquero F., Moya A., y J.C. Galán. Evolutionary trajectories among extended spectrum beta-lactamase enzymes belonging to the CTX-M-1 cluster. 18<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, oral presentation 0342. Barcelona, 2008.

- 7.4.2.2. Novais A., Cantón R., Valverde A., Baquero F., y T. M. Coque. La diseminación y persistencia de TEM-4 en España se asocia a clones persistentes de *E. coli* y *K. pneumoniae* y plásmidos epidémicos de la familia repFIIA. XIII Congreso de la Sociedad Española de de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Poster número 17. Madrid, 2008.

- 7.4.2.3. Tedim Pedrosa A., Novais A., Machado E., Cantón R., Peixe L., y T.M. Coque. Recent Dissemination of *bla*<sub>TEM-52</sub>-producing *Enterobacteriaceae* in Portugal is caused by spread of Inc11 plasmids among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clones. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Poster presentation. Barcelona, 2008.

## 7.4.3. ARTÍCULOS DE REVISIÓN

- 7.4.3.1. Cantón R., Novais A., Valverde A., Machado E., Peixe L., Baquero F., y T. M. Coque. 2008. Prevalence and spread of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 1:144-53. Review.

**Índice de impacto: 2,679.**

- 7.4.3.2. Cantón R., Valverde A., Novais A., Baquero F., y T. M. Coque. 2007. Evolución y panorama actual de las BLEE. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 25;supl 2:2-10.

**Índice de impacto: 1.**